

# Analyse kritischer Einflussfaktoren auf die Proteinexpression im zellfreien System



Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der  
Naturwissenschaften (*Dr. rer. nat.*)  
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III  
-Biologie und Vorklinische Medizin-  
der Universität Regensburg

vorgelegt von

**Roland Hofweber**

aus Regensburg

Regensburg  
August 2006

Promotionsgesuch eingereicht am: 19.7.2006

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Dr. H. R. Kalbitzer

Prüfungsausschuss:	Vorsitzender:	Prof. Dr. R. Witzgall
	1. Gutacher:	Prof. Dr. Dr. H. R. Kalbitzer
	2. Gutacher:	Prof. Dr. R. Wagner
	3. Prüfer	Prof. Dr. R. Sterner

Für MAGDALENA

# Gliederung

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Das Prinzip der <i>in-vitro</i> Transkription/Translation	1
1.2	Apparative Durchführung der zellfreien Expression	4
1.3	Anwendungsgebiete der zellfreien Proteinexpression	7
<b>2</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>Zusatz von Kälteschockproteinen, den putativen RNA Chaperonen</b>	<b>11</b>
3.1	Einleitung	11
3.2	Ergebnisse	14
3.2.1	Effekte von CSPs auf die kombinierte Transkription/ Translation	14
3.2.2	Inhibition der <i>in-vitro</i> Transkription durch Kälteschockproteine	18
3.2.3	Auswirkungen von Kälteschockproteinen auf die <i>in-vitro</i> Translation	21
3.2.4	Umkehrung des Hemmeffekts durch kompetitive Bindung von Oligonukleotiden	22
3.3	Diskussion	23
3.3.1	Effekte von CSPs bei der kombinierten Transkription/Translation	24
3.3.2	Auswirkungen von Kälteschockproteinen auf die Transkription	26
3.3.3	Die Wirkung von Kälteschockproteinen auf die Translation	27
3.3.4	Bestimmung der apparenten Dissoziationskonstanten aus den vorliegenden Daten	28
<b>4</b>	<b>Anwendung von optimierten synthetischen Genen</b>	<b>30</b>
4.1	Einleitung	30
4.2	Ergebnisse	35
4.2.1	Die verwendeten Konstrukte	35
4.2.2	<i>In-vitro</i> -Expressionsstudien im auf <i>E. coli</i> basierenden System	36
4.2.3	Vorbereitungen zur präparativen Expression	39



4.2.4	Die präparativen Expressionen	41
4.2.5	Ergebnisse der Durchflusszytometrie der Aufnahme von PTD-p24 Chimären in menschliche Zellen	42
4.3	Diskussion	43
4.3.1	Die Auswahl der verwendeten Konstrukte	44
4.3.2	Test der zellfreien Expression von p24 Chimären	45
4.3.3	Modifikationen des Expressionssystems für eine Großpräparation	47
4.3.4	Die präparativen Expressionen	48
4.3.5	Die erhaltenen Expressionsraten	48
4.3.6	Aufnahme von PTD/p24 Chimären in 293 T-Zellen	50
<b>5</b>	<b>Peptidexpression im zellfreien System</b>	<b>51</b>
5.1	Einleitung	51
5.2	Ergebnisse	55
5.2.1	Direkte Expression der Peptide, markiert mit C-terminalem His <sub>6</sub> -Tag	55
5.2.2	N-Terminale Fusion von amyloid- $\beta$ Peptiden an Proteine als Expressionshelfer	57
5.2.3	N-Terminale Fusion von amyloid- $\beta$ Peptiden mit kurzen Expressionstags	59
5.2.4	Abspaltung des amyloid- $\beta$ Peptids durch Enterokinase	61
5.2.5	Abspaltung des amyloid- $\beta$ Peptids durch TEV Protease	67
5.2.5.1	Das Konstrukt pET14bCAT A $\beta$ <sub>40</sub> TEV	67
5.2.5.2	Das Konstrukt pET14bCAT A $\beta$ <sub>40</sub> TEV + Linker	68
5.2.5.3	Das Konstrukt pK7 CAT A $\beta$ <sub>40</sub> TEV + Linker	69
5.2.6	Die präparative Aufreinigung	72
5.3	Diskussion	75
5.3.1	Die direkte Expression der amyloid- $\beta$ Peptide	75
5.3.2	Die Auswahl eines geeigneten Expressionskonstrukts	76
5.3.3	Die Auswahl der Proteaseschnittstelle	77
5.3.4	Die Präparation von A $\beta$ <sub>40</sub>	78
<b>6</b>	<b>Materialien</b>	<b>80</b>

<b>7</b>	<b>Methoden</b>	<b>89</b>
7.1	Molekularbiologische Methoden	89
7.1.1	Allgemeine molekularbiologische Methoden	89
7.1.1.1	Agarosegelelektrophorese	89
7.1.1.2	Reinigung von DNA aus Agarosegelen	89
7.1.1.3	Herstellung kompetenter Zellen	89
7.1.1.4	DNA-Sequenzierung	90
7.1.1.5	Herstellung von Glycerinkulturen	90
7.1.2	Klonierung von DNA	91
7.1.2.1	Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	91
7.1.2.2	Restriktionsverdau von DNA	92
7.1.2.3	Dephosphorylierung von linearen Vektoren	92
7.1.2.4	Ligation	93
7.1.2.5	Transformation	93
7.1.2.6	Kolonie-PCR	94
7.1.2.7	Plasmid-DNA Präparation aus <i>E. coli</i>	94
7.1.2.8	Ortsspezifische Mutagenese	95
7.1.3	RNA Synthese und Aufreinigung	96
7.2	Proteinbiochemische Methoden	97
7.2.1	Methoden zur zellfreien Proteinsynthese	97
7.2.1.1	Herstellung eines <i>E. coli</i> S30 Extraktes	97
7.2.1.2	Expression und Aufreinigung von T7 RNA-Polymerase	98
7.2.1.3	<i>In-vitro</i> Proteinexpression im Batchverfahren	99
7.2.1.4	<i>In-vitro</i> Translation von gereinigter mRNA	101
7.2.1.5	Präparativer <i>in-vitro</i> Expressionsansatz im DispoDialyzer	102
7.2.1.6	Nachweis von CAT	104
7.2.2	Heterologe Expression von Proteinen in <i>E. coli</i>	105
7.2.2.1	Expression und Aufreinigung von <i>TmCSP</i>	105
7.2.2.2	Expression und Aufreinigung von <i>BsCSP</i> B	106
7.2.2.3	Expression und Aufreinigung von <i>BcCSP</i>	107
7.2.2.4	Expression und Aufreinigung von TEV-Protease	107

	7.2.2.5	Expression und Aufreinigung von amyloid- $\beta$ Fusionsproteinen	108
	7.2.3	Allgemeine biochemische Techniken	109
	7.2.3.1	Aufreinigung von zellfrei exprimiertem Protein	109
	7.2.3.2	TCA-Fällung	109
	7.2.3.3	Acetonfällung	109
	7.2.3.4	SDS-PAGE nach Lämmli	110
	7.2.3.5	SDS-PAGE nach Schägger und von Jagow	111
	7.2.3.6	Coomassie-Färbung	111
	7.2.3.7	Westernblot	112
	7.2.3.8	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	112
	7.2.3.9	Massenspektrometrie	113
	7.2.3.10	Edman-Abbau	113
	7.2.3.11	Die Aufreinigung von amyloid- $\beta$ Peptiden	113
	7.3	Fitten von Bindungsisothermen	114
<b>8</b>		<b>Zusammenfassung</b>	<b>115</b>
<b>9</b>		<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>117</b>
<b>10</b>		<b>Anhang</b>	<b>128</b>
	10.1	Energy dot plots	128
	10.2	Durchflusszytometrie nach p24 Applikation auf 293T Zellen	130
	10.3	Sequenzen	138
	10.4	Abkürzungsverzeichnis	139
<b>11</b>		<b>Danksagung</b>	<b>141</b>
<b>12</b>		<b>Erklärung</b>	<b>142</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Prinzip der *in-vitro* Transkription/Translation

Die Methodik der zellfreien Proteinexpression hat ihre Anfänge in einem Experiment von Zamecnik *et al.*, (1958), in dem gezeigt wurde, dass Proteinbiosynthese an isolierten Ribosomen ablaufen kann, wenn man tRNA und Nukleotide zugibt. Dies war der erste von vielen Schritten, die notwendig waren für die Aufklärung der Translationszusammenhänge. Ein weiterer wichtiger Schritt in dieser frühen Phase war die Entdeckung von Aminoacyl-tRNA Synthetasen durch Hoagland *et al.*, 1958. Marshall Warren Nirenberg und Heinrich Matthaei (Abbildung 1.1) schließlich gelang es 1961, erstmals in einem zellfreien Translationssystem ausgehend von exogener mRNA oder gar von synthetischen Polyribonukleotiden Protein herzustellen (Nirenberg *et al.*, 1961 und Matthaei *et al.*, 1961).

Dieses legendäre Poly-U Experiment wird von vielen Genetikern als das bedeutendste des 20. Jahrhunderts angesehen.

Bei diesem Experiment wurden *E. coli* Zellen aufgeschlossen und daraus entweder S30 oder S100 Lysate präpariert. Die S30 Lysate wurden durch Zentrifugation bei 30000 g von unlöslichen Zellresten befreit, bei einem S100 Lysat hingegen wurden zusätzlich dazu die Ribosomen bei 105000 g abgetrennt. Darauf basierend war es möglich, den genetischen Code vollständig zu entschlüsseln. Während zu dieser Zeit die zellfreie Proteinexpression ein reines Instrument war, um die Translation aufzuklären, hat sich mittlerweile aus dieser Methode der Grundlagenforschung eine

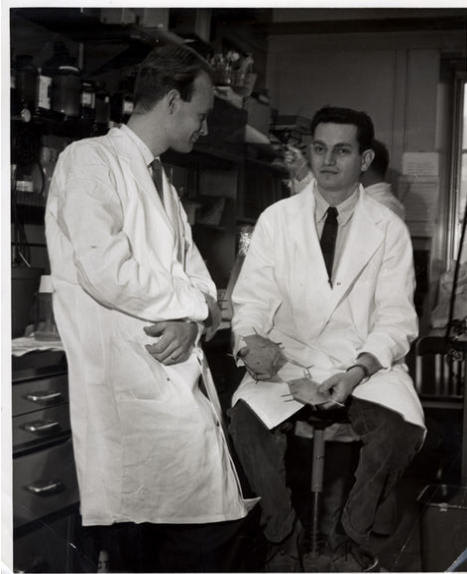


Abbildung 1.1: Heinrich Matthaei und Marshall Warren Nirenberg 1961 in Bethesda. Am 27. Mai 1961 um 3.00 Uhr gelang ihnen erstmals das Poly-U Experiment, das den Durchbruch bei der Entschlüsselung des genetischen Codes darstellte (Quelle: [www.wikipedia.de](http://www.wikipedia.de)).

Methode entwickelt, mit der routinemäßig große Mengen an Protein präpariert werden können.

Ein bedeutender Schritt auf diesem Weg war die Kopplung von Transkription und Translation in einem gemeinsamen Ansatz. Dieses Prinzip geht auf die Arbeiten von DeVries und Zubay (1967) zurück, die die *de-novo* Synthese einer Untereinheit der  $\beta$ -Galactosidase in einem Lysat von *E. coli* nachweisen konnten, nachdem dafür codierende DNA zugesetzt worden war. Durch die Kopplung von Transkription und Translation konnte ein entscheidender limitierender Faktor der Proteinsynthese umgangen werden. Bei der *in-vitro* Translation isolierter mRNA (Nathans *et al.*, 1962) nämlich kann die Expression nur so lange erfolgen, bis die biologisch sehr instabile mRNA (Jermutus *et al.*, 1998, Matveev *et al.*, 1995, Ryabova *et al.*, 1998) degradiert worden ist. Wenn jedoch im gekoppelten System durch eine RNA Polymerase ständig neue mRNA von der DNA transkribiert wird, kann die Expression länger ablaufen. Aus diesem Grunde wird in modernen, auf *E. coli* basierenden Systemen, überwiegend die gekoppelte Transkription/Translation durchgeführt (Kigawa *et al.*, 1999, Spirin, 2004). Heute wird dabei jedoch nicht mehr die endogene RNA Polymerase des Organismus selbst verwendet, sondern virale RNA Polymerasen in Kombination mit ihren spezifischen Promotoren, zum Beispiel das System des T7 Bakteriophagen. Der Vorteil hierbei besteht darin, dass allein die RNA des gewünschten Gens hergestellt wird, da andere eventuell noch vorhandene Gene unter einem nichtviralen Promotor stehen, und dass besonders durch die enorme Prozessivität der Viruspolymerase insgesamt sehr viel größere Mengen an RNA entstehen. Die T7 RNA Polymerase kann dabei bereits im *E. coli*-Stamm, der für die Lysatgewinnung verwendet wird, überexprimiert sein, wodurch die Polymerase schon im Lysat vorliegt (Nevin and Pratt, 1991). Alternativ dazu kann die Polymerase in aufgereinigter Form (zum Beispiel nach Zawazki and Gross, 1991) dem System in definierter Menge zugesetzt werden (Kigawa *et al.*, 1995). Weiterhin besteht die Möglichkeit, durch Zusatz des Antibiotikums Rifampicin (Nevin and Pratt, 1991) die endogene RNA Polymerase zu hemmen, um eine unnötige Verschwendung von Nukleotiden und anderen Ressourcen zu vermeiden.

Mit dem Lysat und der RNA Polymerase waren somit die Grundkomponenten eines präparativ interessanten gekoppelten Expressionssystems bekannt.

Prinzipiell sind zur Herstellung eines aktiven Lysats alle Zellen geeignet, die hochaktive Translationsfaktoren bei gleichzeitig geringer Nuklease- und Proteaseaktivität besitzen. Praktisch haben sich neben dem bereits beschriebenen Prokaryoten *E. coli* auch andere Organismen als Quelle für translationsaktive Zelllysate bewährt. Dazu zählen vor allem die

eukaryotischen Systeme basierend auf Kaninchenretikulozyten (Ryabova *et al.*, 1989) oder Weizenembryos (Anderson *et al.*, 1983, Madin *et al.*, 2000).

Diese Alternativen zu dem am längsten verwendeten Bakterium *E. coli* haben einerseits den Vorteil eines eukaryotischen Translationsapparats. Dieser ist geeigneter, die zumeist interessierenden eukaryotischen Proteine zu synthetisieren, da ihre Translationsfaktoren an den Umgang mit eukaryotischer mRNA angepasst sind (Spirin, 2004) und da auch die tRNA Population besser an die Codonverteilung in eukaryotischen Proteinen angepasst ist. Andererseits ist das Translationssystem der Eukaryoten stabiler, sodass die Expression über eine längere Zeit ablaufen kann. Berichtet wurde von Translationszeiten von 60 Stunden (Madin *et al.*, 2000) bis zu über 14 Tagen (Sawasaki *et al.*, 2002). Jedoch haben eukaryotische Systeme gravierende Nachteile: Neben einer generell geringen Expressionsgeschwindigkeit können durch Lysate aus Weizenkeimlingen keine posttranslationalen Modifikationen der eukaryotischen Proteine, zum Beispiel durch Glycosylierung, eingeführt werden. Dies ist nur denkbar bei Kaninchenretikulozyten, bei denen die Glycosylierung mit der Translation durch Zugabe von Mikrosomen gekoppelt ist (Spirin, 2004). Jedoch sind Kaninchenretikulozytenlysate sehr viel aufwendiger in der Herstellung, was die technische Anwendung einschränkt. Hinzu kommt, dass über die Konstruktion effizienter Expressionsvektoren für die eukaryotische zellfreie Expression wenig bekannt ist. Dafür müssten stets die 3' und 5' untranslationierten Bereiche der Zielgene optimiert werden, da diese für die Stabilität und Translationseffizienz entscheidend sind (Endo & Sawasaki, 2004). Demgegenüber stehen die hochproduktiven bakteriellen Lysate. Diese meist aus *E. coli* hergestellten Extrakte zeichnen sich durch ihre einfache Verfügbarkeit und eine hohe initiale Translationsgeschwindigkeit (Kigawa *et al.*, 1999) aus. Die relativ kurze Lebensdauer dieser Systeme kann durch Dialysesysteme verlängert werden (Baranov & Spirin, 1993), sodass innerhalb eines Tages pro Milliliter Milligrammmengen an Zielprotein synthetisiert werden können (Kigawa *et al.*, 1999 und 2004). Außerdem sind die benötigten genetischen Konstrukte sehr einfach, es genügt ein effektiver Promotor (Nevin and Pratt, 1991) und es können sogar aufgereinigte PCR Produkte eingesetzt werden (Martemyanov *et al.*, 1997).

Ein weiterer unschätzbarer Vorteil besteht darin, dass von diesem Organismus sehr leicht Mutanten mit verringerten degradierenden Aktivitäten verfügbar sind. Dazu gehören die A19 und MRE 600 Stämme mit reduzierten Nukleaseaktivitäten (Pratt, 1984 und Zubay, 1973) beziehungsweise die BL21 Stämme mit ihren Defizienzen bezüglich der OmpT Endoprotease und der lon Protease (Kigawa *et al.*, 2004, Hofweber *et al.*, 2005).

Darüberhinaus kann durch Spontanmutationen des ribosomalen Proteins S12 eine weitere Erhöhung der Effizienz erreicht werden (Chumpolkulwong *et al.*, 2004).

Basierend auf diesen Erkenntnissen entstand im letzten Jahrzehnt eine Methode, die die modernen Anforderungen großer struktureller Proteomik- und Genomikprojekte erfüllen kann (Yokojama *et al.*, 2000 und 2003), wobei insbesondere der Bedarf an parallelisierbarer und automatisierbarer Expression Berücksichtigung finden konnte. Denn die zellfreie Proteinexpression ermöglicht es, Proteine maßgeschneidert herzustellen, ohne auf den Wirtsorganismus und seine zelluläre Physiologie Rücksicht nehmen zu müssen, wodurch cytotoxische, schlecht exprimierende oder instabile Proteine besser erforscht werden können. (Spirin, 2004)

Aus diesen Gründen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit prokaryotischen Lysaten von *E. coli* BL21 gearbeitet.

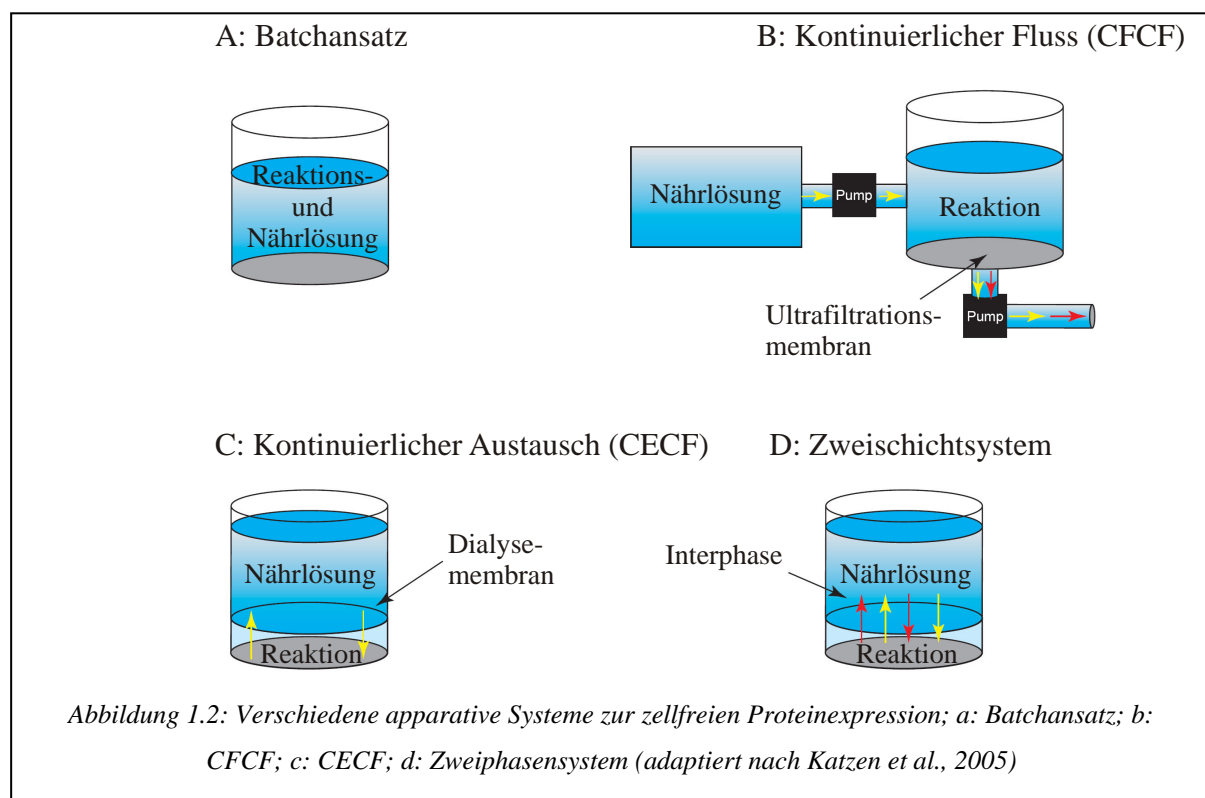
## 1.2 Apparative Durchführung einer zellfreien Expression

Ursprünglich wurde eine gekoppelte Transkriptions/Translationsreaktion in einem einfachen Gefäß durchgeführt. Dabei lagen bei dem sogenannten Batchverfahren alle benötigten Komponenten von Anfang an im Ansatz vor (Abbildung 1.2a). Dies waren neben dem Zelllysat vor allem Aminosäuren, Nukleotide, Energievorläufer, das Gen für das Zielprotein auf einem Plasmid und die RNA Polymerase. Die anfängliche Expressionsrate bei diesem System ist sehr hoch, jedoch ebbt die Reaktion je nach System schon im Zeitraum von 20 Minuten (Kim *et al.*, 1999) bis zu einer Stunde ab (Kigawa *et al.*, 1999 und 1995). Der Grund dafür ist der schnelle Verbrauch an Energie und Ressourcen bei gleichzeitiger Akkumulation von inhibitorischen Nebenprodukten. Idealerweise konnten anfangs mit diesem System Gesamtmengen von ca. 100 µg/ml an Zielprotein hergestellt werden (Kim *et al.*, 1996). Um diese Gesamtmenge zu erhöhen, wurden Systeme für den fortlaufenden Energienachschub entwickelt. Das erste bekannte System war das von Spirin *et al.*, 1988 entwickelte „Continuous Flow Cell Free“ (CFCF) (Abbildung 1.2b), das aus einer Reaktionskammer mit einer Dialysemembran bestand. In diese Kammer wurde kontinuierlich eine Nährlösung mit Aminosäuren, Energieträgern und Nukleotiden gepumpt. Über die Dialysemembran wurden verbrauchte Energievorläufer, Nukleotide und Abfallprodukte ausverdünnt. Mit diesem System konnte die Expressionsdauer auf bis zu 40 Stunden ausgedehnt werden, jedoch wurden dabei neben den Abfallprodukten mit der Zeit auch essentielle Initiationsfaktoren

ausverdünnt (Kim *et al.*, 1996), sodass die Expressionsrate oft unter 10  $\mu\text{g}/(\text{ml}\cdot\text{h})$  betrug. Dadurch war die Endmenge an synthetisiertem Protein nicht höher als beim reinen Batchverfahren. Es wurde postuliert, dass eine gewisse Organisation der Proteine während der Expression („dynamische Komplexierung“ nach Endo *et al.*, 1992) dabei ein vollständiges Ausverdünnen der Proteine verhindert.

Dieses Ausverdünnen konnte geringfügig reduziert werden durch die Verwendung von „Y-Flow“ Reaktoren, bei denen das Zielprotein durch 2 verschiedene Membranen separat von den Abfallprodukten abgetrennt werden konnte (Spirin, 2004, Shirokov *et al.*, 2002).

Um diesen Nachteil der Dialysesysteme vollständig auszuräumen, wurde die „Continuous Exchange Cell Free“ (CECF)-Technologie entwickelt. Dabei wird die Nährlösung nicht kontinuierlich in die Reaktion gepumpt, sondern Reaktionslösung und Nährlösung stehen zueinander über eine Dialysemembran (Abbildung 1.2c) in Verbindung (Kim *et al.*, 1996, Madin *et al.*, 2000).



Mit dieser Technik gelang es, die bislang höchsten Zielproteinkonzentrationen von einigen Milligramm pro Milliliter zu synthetisieren. Erwähnenswert sind die Expression von 6 mg/ml Chloramphenicol-Acetyltransferase (Kigawa *et al.*, 1999) und die Expression von 9,7 mg/ml GFP (Endo and Sawasaki 2004).

Diese Technologie vereint bei geringerer Reaktionsdauer eine höhere Expressionsgesamtmenge in Kombination mit einem geringeren apparativen Aufwand und einer besseren



Ausbeute an Material im Vergleich zum CFCF-Reaktor. Aus diesem Grunde wird zu präparativen Zwecken neben dem Batchansatz überwiegend die CECF Technik verwendet (z.B. Roche RTS System).

Alternativ zur Membran als Abgrenzungsvorrichtung zwischen Reaktionslösung und Nährlösung wurden weitere Systeme entwickelt.

So kann die Reaktionslösung in Vesikel verpackt sein und in einer Säule von der Nährlösung umspült werden (Spirin *et al.*, 1992). Eine weitere Möglichkeit für einen CECF-Reaktor, die auch ohne großen Aufwand in größerem Maßstab durchgeführt werden kann, ist eine Sephadex G 25 Säule, die die Nährlösung in den Poren zurückhält, während im Zwischenraum die Reaktionslösung vorbeifließt (Buchberger *et al.*, 2002).

Die genannten Reaktoren haben jedoch einen entscheidenden Nachteil: Die Notwendigkeit, eine Dialysereaktion oder einen Säulenlauf durchzuführen, ist schwer automatisierbar und parallelisierbar, wie es von Hochdurchsatzprojekten der strukturellen Genomik gefordert wird. Aus diesem Grunde gibt es inzwischen Ansätze, die Reaktion ohne mechanische Kompartimentierung durchzuführen. Sawasaki *et al.*, 2002 gelang es, in einer Mikrotiterplatte die Reaktionslösung mit der Nährstofflösung zu überschichten und den Austausch von Substraten und Produkten durch Diffusion, erleichtert durch Schütteln, zu bewerkstelligen (Abbildung 1.2d). Dadurch ist es nun prinzipiell möglich, auch im kleinen Maßstab für funktionelle Studien genügende Mengen ausgehend von cDNA-Bibliotheken zellfrei zu synthetisieren.

Aufgrund des Bedarfs an automatisierbaren Expressionssystemen wurde parallel zur Entwicklung des CECF-Reaktors die Technik des einfachen Batchansatzes weiterentwickelt.

Dabei war es das Ziel, herauszufinden, warum die Reaktion nach kurzer Zeit zum Erliegen kommt und wie diese Problematik ohne großen apparativen Aufwand umgangen werden kann.

Als Energiequelle wurde anfangs die energiereiche Phosphatbindung des Phosphoenolpyruvats verwendet, welches über die Pyruvatkinase ATP regenerieren konnte. Dieses System hatte jedoch Nachteile. Zum einen werden 70% des Phosphoenolpyruvats (PEP) innerhalb von 30 Minuten durch Phosphatasen des S30 Lysates abgebaut (Kim *et al.*, 1999). Weiterhin wird dabei anorganisches Phosphat gebildet, welches Magnesiumionen bindet. Dadurch wird die Translation beeinflusst, die das Magnesium als Cofaktor benötigen würde. Es wurden verschiedene Methoden entwickelt, um dieses Problem zu umgehen.

So konnte zum Beispiel die Expression verlängert werden, wenn alle 20 Minuten neues PEP in Kombination mit Magnesium zugegeben wurde (Kim *et al.*, 2000). Weiterhin wurden

andere Energieträger etabliert, wie zum Beispiel das System basierend auf der Pyruvatoxidase aus *Pediococcus spp.* Dabei wird aus dem Energieträger Pyruvat mit Phosphat mit Hilfe von Thiaminpyrophosphat und Flavin-Adenin-Dinukleotid Acetylphosphat generiert, welches mit der endogenen Acetylkinase die Regeneration von ATP bewerkstelligt. Dabei entstehendes  $H_2O_2$  wird durch Luftsauerstoff mit Hilfe der endogenen Katalase abgebaut (Kim *et al.*, 1999), wodurch die Expressionsdauer auf 2 Stunden ausgedehnt werden konnte. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Glucose-6-Phosphat genauso wie andere Intermediate der Glycolyse zur Energiegewinnung herangezogen werden können, wenn auch mit begrenzter Effektivität von bis zu 120  $\mu\text{g/ml}$  (PANOx-System Kim *et al.*, 2001). Im CYTOMIM System (Jewett *et al.*, 2004) wurde mit diesem Energieregenerationssystem in Kombination mit einem der Zelle ähnlicherem Ionenmilieu und zellähnlichen Polykationen bis zu 700  $\mu\text{g/ml}$  CAT innerhalb von 6 Stunden im Batchsystem hergestellt.

Neben den Energieträgern haben sich auch bestimmte Aminosäuren als kritisch für die Dauer einer Batchreaktion erwiesen. Man fand heraus, dass die Aminosäuren Arginin, Cystein, Serin und Tryptophan erhöhter Degradation unterliegen (Kim *et al.*, 2000, Michel-Reydellet *et al.*, 2004). Wenn gemeinsam mit PEP und  $Mg^{2+}$  diese Aminosäuren in bestimmten Abständen zugegeben werden, kann die Expression nochmals verlängert werden (Kim *et al.*, 2000), sodass nach 2 Stunden bereits ca. 420  $\mu\text{g/ml}$  CAT exprimiert werden konnten. Alternativ dazu können die Enzyme, die für die Aminosäuredegeneration verantwortlich sind, im Bakterienstamm, von dem das Lysat hergestellt wird, deletiert werden (Michel-Reydellet *et al.*, 2004).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der Batchansatz wegen seines effizienten Umgangs mit teuren Energievorläufern und anderen Substraten auch weiterhin für Präparationen interessant ist. Ermöglicht wird dies vor allem durch die modernen Energieregenerationssysteme.

### 1.3 Anwendungsgebiete der zellfreien Proteinexpression

Anfangs war die zellfreie Proteinsynthese eine Methode der Grundlagenforschung, um die Zusammenhänge der Translation, zum Beispiel den genetischen Code, zu untersuchen. In den meisten Fällen wurde das Produkt durch den Einbau radioaktiver Aminosäuren markiert, damit eine Proteinsynthese überhaupt nachgewiesen werden konnte (Nirenberg und Matthaei 1961). Durch die unter 1.2 beschriebenen Verbesserungen war es möglich, kontinuierlich die

Ausbeute an Zielprotein zu erhöhen. Dadurch hat sich die zellfreie Proteinexpression, im Besonderen die gekoppelte *in-vitro* Transkription/Translation zu einer echten Alternative zu den etablierten Expressionsmethoden entwickelt. Gegenüber der chemischen Peptidsynthese nach Merrifield (Merrifield 1965) hat diese Methode den Vorteil, dass auch längere Peptide herstellbar sind und im Gegensatz zur *in-vivo* Expression auch Proteine, die für den Wirtsorganismus toxisch sind, hergestellt werden können.

Außerdem zeichnet sich die zellfreie Proteinsynthese im Vergleich zu diesen Methoden vor allem durch die Geschwindigkeit des Ablaufs aus. Die Expression kann ohne langwierige Transformationen und Wachstumsphasen durchgeführt werden. In der Regel kann innerhalb von ein bis zwei Arbeitstagen ein Protein exprimiert und aufgereinigt werden. Hierbei wirkt sich positiv aus, dass kein Zellaufschluss mehr durchgeführt werden muss. Ein weiterer Vorteil ist, dass Proteine, die für den Wirtsorganismus problematisch oder unlöslich sind, nicht mehr in Einschlusskörperchen verpackt werden können. Dadurch wird im Allgemeinen die Anzahl der Proteine, die löslich und nativ gefaltet exprimiert werden kann, erhöht (Kolb *et al.*, 1994 und 2000). Da das System der Zellfreiexpression wegen einer fehlenden Kompartimentierung wie zum Beispiel durch eine Zellmembran offen für Manipulationen von außen ist, kann dies ebenfalls zur Verbesserung der Expression oder der Faltung verwendet werden. So können Proteine in Gegenwart ihrer natürlichen Bindungspartner, zum Beispiel von Cofaktoren oder Liganden, exprimiert werden. Ebenso können verschiedene Unter-einheiten eines multimeren Proteinkomplexes simultan coexprimiert werden (Miyasaki-Imamura *et al.*, 2003, Knapp and Swartz 2004, Komar *et al.*, 1997, Lehmann *et al.*, 2003).

Der Einsatz von Chaperonen scheint jedoch die Faltung nicht sehr effektiv zu verbessern (Spirin, 2004).

Ebenfalls ist es möglich, korrekte Disulfidbrücken in Proteinen auszubilden, zum Beispiel durch Einsatz der Protein-Disulfid-Isomerase (PDI, Ryabova *et al.*, 1997) oder durch Anwendung eines oxidierenden Milieus (Glutathion, Iodoacetamid) bei der Zellfreiexpression anstelle von normalerweise reduzierenden Bedingungen (Yin and Swartz 2004, Kim and Swartz 2004). Die Offenheit des Systems erlaubt es auch, Detergentien zuzusetzen, wodurch es möglich ist, Membranproteine in hohen Mengen (Klammt *et al.*, 2004) und in guter Löslichkeit zu exprimieren. Als Beispiel sei die Expression eines Ionenkanals in aktiver Form (Berrier *et al.*, 2004) und die Expression eines G-Protein gekoppelten Rezeptors genannt (Ishihara *et al.*, 2005).

Neben den aufgeführten Möglichkeiten bietet das System vor allem bei Durchführung als Batchansatz den großen Vorteil der Parallelisierbarkeit und Automatisierbarkeit. So können

große Proteinbibliotheken, zum Beispiel verschiedene Mutationen eines Proteins (Miyazaki-Imamura *et al.*, 2003) parallel exprimiert und weiterverarbeitet werden. In Kombination mit der Verwendung von genetischer Information in Form von PCR-Fragmenten entsteht dadurch eine sehr leistungsfähige Methode (Rungpragayphan *et al.*, 2002 und 2003, Lesley *et al.*, 1991, Ohuchi *et al.*, 1998, Martemyanov *et al.*, 1997). Diese Anwendung ist insbesondere für große Projekte der strukturellen Genomik und Proteomik von Interesse (Betton *et al.*, 2004, Yokoyama *et al.*, 2000, Katzen *et al.*, 2005). In Kombination mit dem neuartigen ligationsunabhängigen Klonieren (LIC: ligation independent cloning) ist es somit möglich, Proteine ohne die Verwendung lebender Zellen über PCR, LIC und IVT herzustellen. Damit steht man kurz davor, die Proteinsynthese von den Limitationen der lebenden Zellen abzukoppeln (Stols *et al.*, 2002, Rungpragayphan *et al.*, 2002).

Die zellfreie Proteinexpression kann außerdem sehr effektiv zur Herstellung von Proteinen für Strukturaufklärungen eingesetzt werden. So können Proteine für die NMR vollständig mit magnetisch aktiven Kernen (Kigawa *et al.*, 1999, Guignard *et al.*, 2002) oder für die Erleichterung röntgenkristallographischer Studien mit Selenomethionin (Kigawa *et al.*, 2002) markiert werden. Desweiteren können Proteine aminosäureselektiv mit Isotopen markiert werden (Kigawa *et al.*, 1995 ; Bennati *et al.*, 2005). Es ist ebenfalls möglich, nur eine einzelne Aminosäure über eine Amber Stop Suppression zu markieren (Yabuki *et al.*, 1998, Kiga *et al.*, 2002). Neueste Arbeiten zeigen sogar die Möglichkeit eines „*stereo array isotope labelling*“ (Kainosho *et al.*, 2006).

Aus diesen Gründen, vor allem wegen der Automatisierbarkeit des Verfahrens, kann davon ausgegangen werden, dass die zellfreie *in-vitro* Transkription/Translation in Zukunft die herkömmlichen Methoden zur Proteinexpression zunehmend ablösen wird.

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Ausgehend von einer Labormethode zur Aufklärung des genetischen Codes (Nirenberg und Matthaei 1961) hat sich die zellfreie Proteinexpression zu einer weitverbreiteten Routinemethode entwickelt. Wie zahlreiche Beispiele aus der Literatur belegen, können mit dieser Methode Proteine in großen Mengen hergestellt werden. Weitere wichtige Vorteile für eine maßgeschneiderte Produktion von Proteinen ergeben sich durch die Offenheit des Systems und die Abwesenheit der Physiologie von lebenden Zellen (Spirin, 2004, Katzen *et al.*, 2005). Prinzipiell ist es nun möglich, jede erdenkliche Aminosäuresequenz in großen Mengen mit korrekter Faltung zu synthetisieren. Dies sollte den Beginn einer neuen Ära der vollautomatisierbaren Proteinsynthese darstellen und so den momentanen Engpass der großen Projekte der strukturellen Genomik beheben (Christendat *et al.*, 2000, Yokoyama 2003). Denn damit würde es möglich sein, dass das Proteom ganzer Organismen in ähnlicher Geschwindigkeit wie ihr Genom aufgedeckt werden könnte. Noch ist die zellfreie Proteinexpression jedoch weit davon entfernt, diese Anforderungen zu erfüllen. Grund dafür ist die unkalkulierbare Expressionsausbeute, denn viele interessante Proteine können nicht effektiv genug exprimiert werden. Dies hat zur Folge, dass sich die auf Durchsatz, aber nicht auf Gründlichkeit ausgelegten Projekte (z.B. RIKEN Genomic Sciences Center) nur mit dem Machbaren befassen („The low hanging fruit“, Christendat *et al.*, 2000, Yokoyama *et al.*, 2000). Ziel der vorliegenden Dissertation ist es, diesen opportunistischen Ansatz zu erweitern und Proteine, die im weit verbreiteten *E. coli* basierten System der gekoppelten Transkription/Translation mit sehr geringer bis gar keiner Effizienz herstellbar sind, effizienter exprimierbar zu machen. Dazu wurden verschiedene Strategien verfolgt, die im Folgenden vorgestellt werden.

## 3 Zusatz von Kälteschockproteinen, den putativen RNA Chaperonen

### 3.1 Einleitung

Bakterien haben es gelernt, auf Änderungen von Umweltbedingungen, wie zum Beispiel auf einen drastischen Temperaturabfall, entsprechend zu reagieren. Bei diesem so genannten Kälteschock wird als erste Reaktion die Expression der meisten Proteine inhibiert. Diese Phase des Kälteschocks wird als Akklimation bezeichnet. Nur eine gewisse Gruppe an Proteinen wird drastisch hochreguliert (Graumann und Marahiel 1999, Thieringer *et al.*, 1998, Jones *et al.*, 1987) und deshalb als Kälteschockproteine bezeichnet. Diese werden jedoch nur in der kurzen Phase des Temperaturübergangs prominent exprimiert, nach der Adaption an die neue Temperatur verringert sich ihre Anzahl wieder (Ermolenko *et al.*, 2002). Die Gruppe von Kälteschockproteinen besteht hauptsächlich aus Proteinen von ca. 65 bis 70 Aminosäuren Länge und hoher Homologie untereinander.

Durch strukturelle Untersuchungen wurde festgestellt, dass sie ein konserviertes Strukturmotiv besitzen, die Beta-Fass-Struktur (Kremer *et al.*, 2001 Schnuchel *et al.*, 1993 Müller *et al.*, 2000). In *E. coli* zum Beispiel wurden 9 verschiedene Kälteschockproteine von sehr hoher Sequenzhomologie entdeckt (Yamanaka *et al.*, 1998). Insgesamt wurden in vielen Dutzend verschiedener Bakterien Proteine gefunden, die zu dieser Familie der Kälteschockproteine homolog sind (Graumann *et al.*, 1996). Außerdem wurde eine sehr große Homologie zu der nukleotidbindenden Domäne der eukaryotischen Y-Box-Proteine festgestellt (Ermolenko *et al.*, 2002). Von diesen Proteinen ist bekannt, dass sie regulierend auf Transkription und Translation wirken (Matsumoto *et al.*, 1998, Wilkinson *et al.*, 2001). Dabei sind die Nukleotidbindemotive RNP1 und RNP2 wichtig, die sowohl in Y-Box Proteinen als auch in Kälteschockproteinen gefunden werden können (Alignment siehe Ermolenko *et al.*, 2002). Daher wird allgemein davon ausgegangen, dass Kälteschockproteine ebenfalls Funktionen in der Genexpressionsregulation wahrnehmen. Es wurde nachgewiesen, dass sie an einzelsträngige DNA oder RNA binden (Lopez *et al.*, 1999 und 2000) und es konnte auch gezeigt werden, dass sie bestimmte Sequenzen anderen vorziehen (Graumann *et al.*, 1994, Lopez *et al.*, 1999). Die Affinität liegt dabei im mikromolaren Bereich. Aufgrund der

vorherrschenden Konzentrationsverhältnisse von mRNA und von Kälteschockproteinen wird davon ausgegangen, dass zumindest beim Kälteschock jede mRNA von mehreren CSPs gebunden wird. Ihre genauen zellulären Funktionen konnten jedoch bisher nicht aufgedeckt werden. Für das Kälteschockprotein CspA aus *E. coli* konnte bei Verwendung von cspA-mRNA nachgewiesen werden, dass es doppelsträngige Bereiche einer RNA entwinden kann. Deshalb wurde vermutet, dass Kälteschockproteine eine RNA-Chaperonaktivität besitzen (Jiang *et al.*, 1997). Der Zusammenhang zwischen dieser Funktion und der Temperaturanpassung der Zelle ist jedoch noch nicht geklärt. Ein essentieller Zusammenhang muss jedoch bestehen, da gezeigt wurde, dass Nonsensemutanten im CspA-Gen von *E. coli* bei Temperaturabfall lethal sind.

Der Kälteschock bewirkt verschiedene Probleme in der Zelle wie Änderungen in der Membranviskosität, verlangsamte enzymatische Reaktionen und Erschwerung der Proteinfaltung (Graumann *et al.*, 1999). Ein Problem, bei dem die Kälteschockproteine wegen ihrer Nukleotidbindungseigenschaften hilfreich sein können, ist der Zusammenbruch der Proteinexpression (Broeze *et al.*, 1978). Der inhibierte Schritt scheint dabei die Initiation zu sein (Friedman *et al.*, 1971). Dieser Vorgang nun kann durch zelluläre Prozesse gesteuert sein oder auch nur durch die Temperatur selbst in dem hochkomplexen ribosomalen System hervorgerufen werden (Ermolenko *et al.*, 2002). Denn durch Verringerung der Temperatur wird die Stärke von Wasserstoffbrückenbindungen, zum Beispiel zwischen zwei Nukleotidsträngen, verstärkt. Dadurch werden partielle Doppelstrangstrukturen von RNA, vor allem von mRNA, stabilisiert. Solche Elemente bilden sich bevorzugt im 5' UTR von Genen aus, wodurch die Shine-Dalgarno-Sequenz vor der Translationsmaschinerie versteckt werden kann (Lopez *et al.*, 2001). Dabei ist es denkbar, dass CSPs hilfreich eingreifen können. In ihrer Funktion als RNA Chaperone (Jiang *et al.*, 1997) hat sich zumindest für die Expression von CspA selbst herausgestellt, dass Kälteschockproteine dabei translationsaktivierend wirken können (Brandi *et al.*, 1996). Ihre Wirkung auf die Translation zeigt sich auch darin, dass die Defekte von Csp-Deletionsmutanten durch IF1, dem Initiationsfaktor 1 der Translation, kompensiert werden können (Weber *et al.*, 2001).

Neben der indirekten Inhibierung besteht auch die Möglichkeit, dass die Zelle selbst die Translation wegen der erhöhten Fehlerrate aktiv stoppt. Man geht davon aus, dass Kälteschockproteine eine regulative Funktion bei der Translationsinitiation bei niedriger Temperatur übernehmen können (Ermolenko *et al.*, 2002). Der genaue Mechanismus ist noch ungeklärt, jedoch ist von homologen Proteinen bekannt, zum Beispiel von den Y-Box Proteinen YB-1 (Izumi *et al.*, 2001) und p50 (Evdokimova *et al.*, 1999), dass sie die Initiation

der Translation bei höherer zellulärer Konzentration inhibieren. Dies aber steht im Widerspruch zu der Erkenntnis, dass CspA der RNA-Chaperontheorie zufolge die Translation der eigenen mRNA stimulieren kann (Brandi *et al.*, 1996).

Um diese Unklarheit auszuräumen, haben Ermolenko *et al.*, 2002 festgestellt, dass es notwendig ist, verschiedene mRNAs bei verschiedenen Temperaturen im zellfreien Expressionssystem unter dem Einfluss verschiedener CSP-Konzentrationen zu exprimieren.

Da im Rahmen dieser Arbeit Möglichkeiten gesucht werden, um die auf *E. coli* basierende gekoppelte Transkription/Translation auf eine größere Auswahl von Proteinen anwendbar zu machen, ist genau dieses postulierte Experiment von besonderem Interesse. Denn bei der Zellfreiexpression tritt oftmals das gleiche Problem auf wie bei lebenden Zellen im Kälteschock: vorhandene mRNA wird nicht translatiert. Aus diesem Grunde kann im *in-vitro* Ansatz bei physiologischer Temperatur mRNA in freier Form, also ohne Ribosomen, im Ansatz akkumulieren, und zwar wegen der hohen Prozessivität der viralen RNA Polymerasen. Die frei vorliegende RNA kann dabei Sekundärstrukturen, wie zum Beispiel Haarnadelschleifen, ausbilden. Sollten Kälteschockproteine wirklich eine allgemein gültige Funktion von RNA-Chaperonen haben, dann müssen sie mit steigender Konzentration das Proteinexpressionsniveau erhöhen. Da jedoch die *in-vitro* Expression im *E. coli* System natürlich bei physiologischer Temperatur optimal verläuft, konnte die Temperatur nicht, wie von Ermolenko *et al.*, 2002 vorgeschlagen, reduziert werden. Aus diesem Grunde wurden die Kälteschockproteine von *Bacillus subtilis* ( $T_{\text{opt}}=35^{\circ}\text{C}$ ), *Bacillus caldolyticus* ( $T_{\text{opt}}=60^{\circ}\text{C}$ ) und *Thermotoga maritima* ( $T_{\text{opt}}=80^{\circ}\text{C}$ ) eingesetzt. Dadurch kann die Konzentrationsabhängigkeit eines Effekts mit drei verschiedenen Bindungsaffinitäten bei einer Temperatur untersucht werden, genau so wie es mit einem Kälteschockprotein bei drei verschiedenen Temperaturen der Fall wäre. Dies ist möglich wegen der extremen Homologie innerhalb der Familie von Kälteschockproteinen.

Mit Hilfe des Einsatzes von CSPs in der gekoppelten Transkription/Translation sowie in den Einzelreaktionen ist es demnach möglich, weitere wichtige Informationen über deren biologische Funktion herauszufinden. Weiterhin könnte damit die Zellfreiexpression einen großen Schritt hin zur allgemeinen Einsetzbarkeit vorangebracht werden, sofern sich die RNA Chaperontheorie bestätigt.



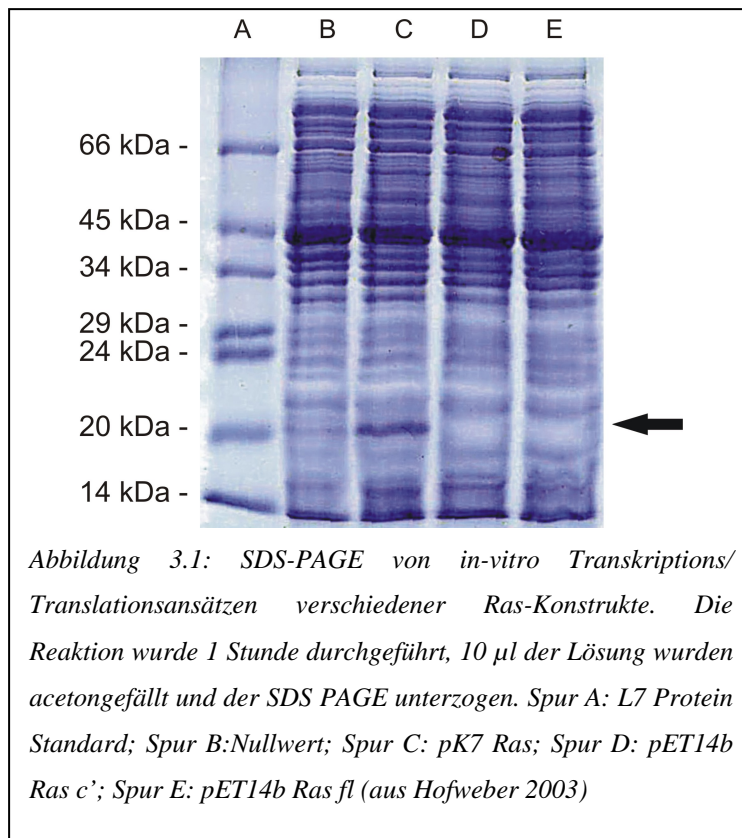
## 3.2 Ergebnisse

### 3.2.1 Effekte von CSPs auf die kombinierte Transkription/Translation

Kälteschockproteine werden als allgemeine RNA Chaperone angesehen. Der Grund dafür liegt in der translationsaktivierenden Wirkung von CspA aus *E. coli*, die es auf die eigene Expression hat (Jiang *et al.*, 1997). Es kann auf der mRNA partielle Doppelstränge unterbinden und dadurch ermöglichen, dass regulative Sequenzen auf der mRNA den Translationsfaktoren und Ribosomen auch im Kälteschock zugänglich bleiben. Im System der kombinierten Transkription/Translation wird davon ausgegangen, daß mRNA wegen der im Vergleich zu den Ribosomen höheren Prozessivität der T7 RNA-Polymerase in ungebundener Form akkumuliert (Spirin, 2002). Diese mRNA geht dabei bei Existenz passender Sequenzen mit sich selbst Basenpaarungen in Form von Haarnadelschleifen ein. Werden diese vermehrt ausgebildet, erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass dadurch regulative Sequenzen im 5' untranslatierten Bereich der mRNA den Translationsfaktoren unzugänglich werden.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde eine zellfreie Expression des Proteins H-Ras durchgeführt, von dem mehrere Plasmide mit sehr verschiedenen DNA-Sequenzen vorliegen. Zum einen ist auf den Plasmiden pET14b ras fl (Volllängenversion von H-Ras, N-terminal His<sub>6</sub>-getaggt) und pET14b ras c' (C-terminal um 23 Aminosäuren verkürztes Protein, N-terminal His<sub>6</sub>-getaggt) die Nukleotidsequenz vorhanden, wie sie im menschlichen Organismus zu finden ist. Eine Alternative dazu stellt das Plasmid pK7 Ras dar, das eine für H-Ras codierende Sequenz enthält, die chemisch synthetisiert wurde. Die synthetische Sequenz ist daraufhin optimiert, dass die Möglichkeiten, Sekundärstrukturen auf der mRNA auszubilden, minimal sind (Miura *et al.*, 1986, Kigawa *et al.*, 1995). Der Unterschied bezüglich der freien Energie zwischen der Wildtypsequenz und der chemisch synthetisierten Sequenz konnte mit dem Programm MFOLD (Zuker *et al.*, 1981) auf 245 kJ /mol beziffert werden (der Berechnung zugrundeliegende „energy dot plots“ befinden sich im Anhang).

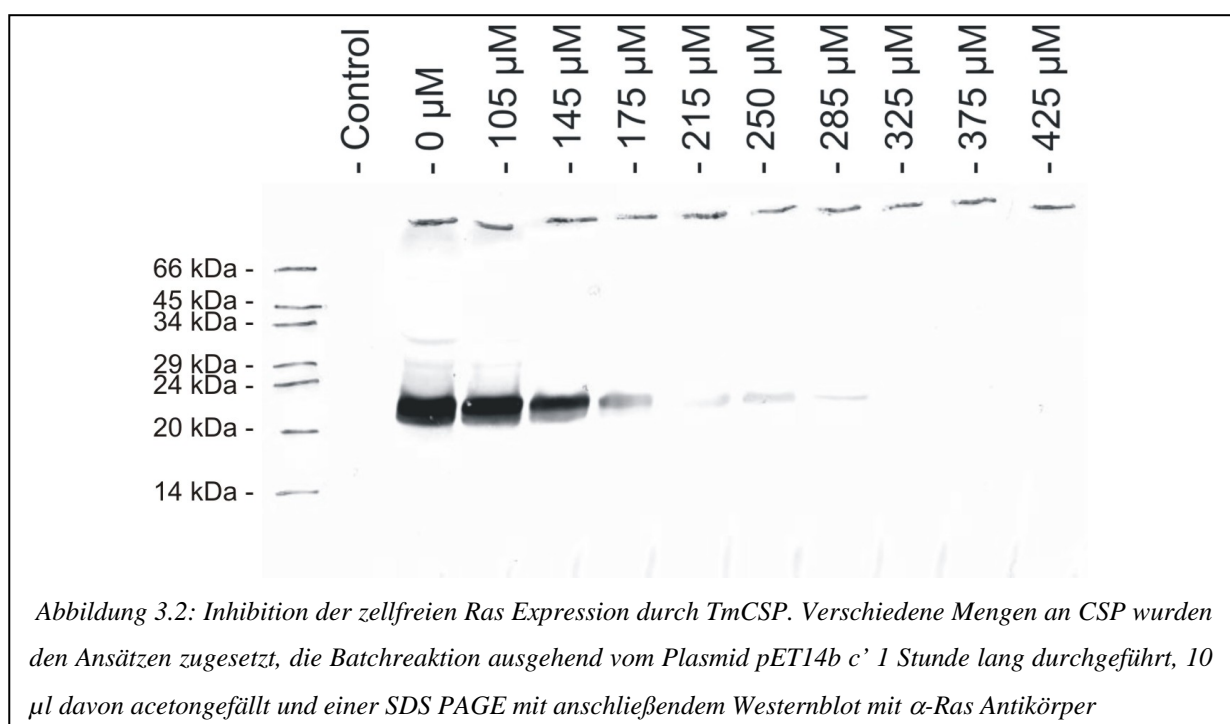
Diese drei Plasmide wurden in einem Batchansatz einer kombinierten Transkription/Translation (siehe 7.2.1.3) unterzogen und anschließend 10 µl davon nach Acetonfällung auf einem 15%igem SDS Polyacrylamidgel nach Lämmli (7.2.3.4) aufgetrennt (Gel siehe Abbildung 3.1).



Die Expression des Proteins Ras ausgehend vom Plasmid pK7 Ras mit seiner optimierten Sequenz ist als einzige der drei Expressionen so stark, dass eine Bande bereits auf dem coomassiegefärbten SDS-PAGE sichtbar ist. Bei den anderen beiden Plasmiden ist keine Bande zu erkennen. Sie werden zwar hergestellt, jedoch kann ihre Expression nur durch Westernblot mit einem Antikörper gegen Ras nachgewiesen werden.

Mit diesem Experiment wurde gezeigt, dass stille Mutationen,

die zu verschiedenen starken Sekundärstrukturen auf der mRNA führen, drastische Expressionsniveauunterschiede verursachen. Deshalb kann postuliert werden, dass der Zusatz von CSPs wegen ihrer putativen RNA-Chaperonfunktion im zellfreien Proteinexpressionssystem der kombinierten Transkription/Translation vorteilhaft sein könnte. Es wird davon ausgegangen, dass mit deren Einsatz Gene, die eine geringe Expression



aufweisen, in ihrer Expressionsrate verbessert werden können. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde pET14b ras c' mittels Batchansätzen in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen an Kälteschockprotein aus *Thermotoga maritima* (TmCSP) exprimiert (Ansatz siehe 7.2.1.3). 10 µl der Reaktion wurden acetongefällt und einem Westernblot mit  $\alpha$ -Ras Antikörper unterzogen (Abbildung 3.2, gefärbt mit 4-Chloro-1-naphtol).

Es ist zu beobachten, dass entgegen der allgemein akzeptierten Annahme keine Erhöhung der Expression, sondern eine konzentrationsabhängige Abnahme stattgefunden hat. Bei mehr als ca. 200 µM TmCSP sind nur noch Spuren von Ras detektierbar. Um diesen Effekt genauer quantifizieren zu können, wurde Chloramphenicol-Acetyltransferase exprimiert, die über einen gekoppelten Enzymtest quantifizierbar ist. Weiterhin wurden in diesem Versuch neben TmCSP auch die Proteine aus *Bacillus subtilis* (BsCSP) und *Bacillus caldolyticus* (BcCSP) eingesetzt. Bei diesen Proteinen sind andere Bindungsaffinitäten gegenüber TmCSP zu erwarten. Deren Ursprungsorganismen wachsen nicht wie *Thermotoga maritima* bei 80°C (hyperthermophiler Organismus), sondern bei 35°C (*Bacillus subtilis*, ein mesophiler Organismus) oder bei 65°C (*Bacillus caldolyticus*, ein thermophiler Organismus). Dadurch

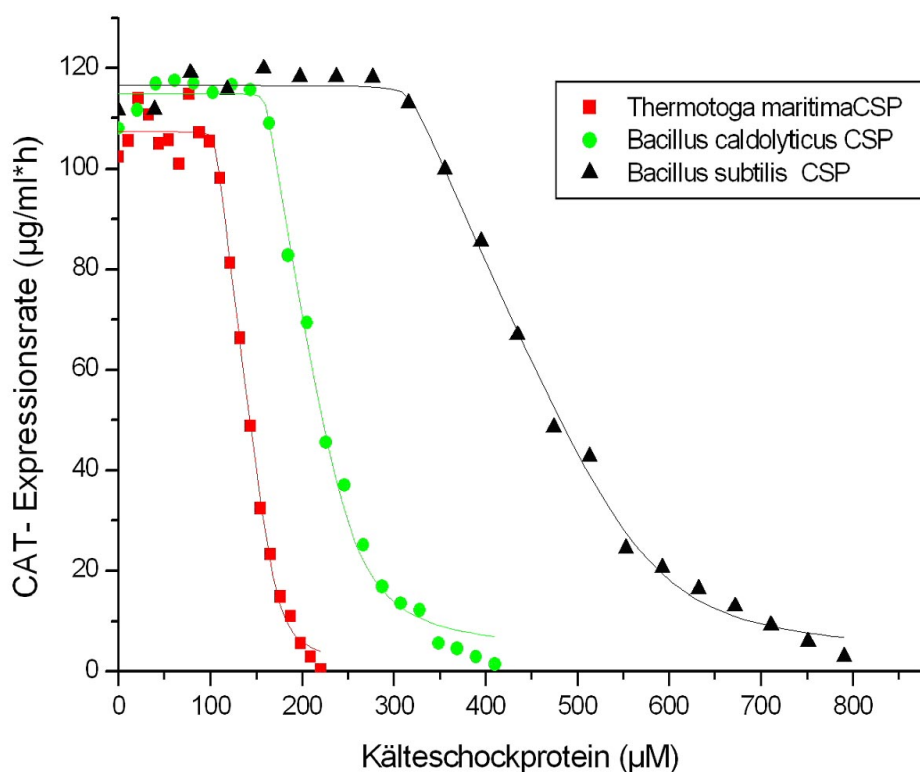


Abbildung 3.3: Konzentrationsabhängige Inhibition der zellfreien CAT-Expression durch Kälteschockproteine verschiedener Organismen. Die exprimierte Menge an CAT wurde über ihre Aktivität (7.2.1.6) analysiert. Rechteck: Zusatz von TmCSP; Kreis: Zusatz von BcCSP; Dreieck: Zusatz von BsCSP. Die jeweilige Fitfunktion zu den experimentellen Daten ist ebenfalls angegeben. Als Funktion wurde Gleichung 2 (siehe 7.3) verwendet.

zeigen sie bei ganz verschiedenen Temperaturen das Phänomen des Kälteschocks, was verschiedene Bindungsaffinitäten der CSPs bedingt. Dieser Befund lässt auf ein unterschiedliches Verhalten der drei Proteine während der Expression bei 37°C schließen. Es ist zu beobachten, dass alle drei Proteine einen konzentrationsabhängigen Abfall in der Expressionsrate des Zielproteins bewirken. In keinem Konzentrationsbereich ist ein expressionsverbessernder Effekt sichtbar. Bei allen drei ist nach einer Anfangsphase mit geringerer Konzentration und keinem Effekt auf die Expression ein rascher Abfall bei steigender Menge an zugesetztem CSP zu beobachten, sodass bei hohen Konzentrationen keine Expression mehr zu beobachten ist. Der qualitative Verlauf des Effekts ist bei allen drei Proteinen gleich, nur die Konzentrationsbereiche, in denen der Einbruch der Expression stattfindet, sind unterschiedlich (siehe Abbildung 3.3),.

Das Protein aus dem hyperthermophilen Organismus zeigt den Effekt (ab ca. 100 µM) als erstes, dann das aus dem thermophilen und zuletzt auch das Protein aus dem mesophilen Bakterium *Bacillus subtilis*, bei dem die Effekte erst bei mehr als ca. 350 µM auftreten.

Aus dem Verlauf der Kurven ist es nun möglich, unter Zuhilfenahme einiger Annahmen (siehe 7.3), eine Quantifizierung der Bindungskonstanten der Kälteschockproteine im System der Transkription/Translation vorzunehmen (siehe Tabelle 1).

Organismus	T <sub>opt</sub> [K] <sup>b</sup>	c <sub>50</sub> [µM] <sup>c</sup>	c <sub>99</sub> [µM] <sup>d</sup>	K <sub>app</sub> [µM] <sup>e</sup>	K <sub>D</sub> [µM] (dT) <sub>7</sub>	K <sub>D</sub> [µM] (dA) <sub>7</sub>
<i>T. maritima</i>	353	139,5	230	0,59	0,01 <sup>f</sup>	4,0 <sup>f</sup>
<i>B. caldolyticus</i>	333	215,0	420	2,33	- <sup>g</sup>	- <sup>g</sup>
<i>B. subtilis</i>	308	451,8	800	4,51	0,27 <sup>h</sup>	- <sup>g</sup>

Tabelle 1: Inhibition der CAT-Expression durch verschiedene Kälteschockproteine

<sup>a</sup> in-vitro Expression durchgeführt bei 310 K

<sup>b</sup> optimale Wachstumstemperatur

<sup>c</sup> CSP Konzentration für 50 % Inhibition

<sup>d</sup> CSP Konzentration für vollständige Hemmung (> 99 %)

<sup>e</sup> apparenter K<sub>D</sub> aus dem Anfitzen der Daten der Zellfreiexpression (3.2.1) mit der Gleichung 2 (7.3). Die erhaltenen apparenten Dissoziationskonstanten sind weitgehend unabhängig von den restlichen Fitparametern

<sup>f</sup> K<sub>D</sub> für die Bindung von (dT)<sub>7</sub> an TmCSP, interpoliert auf 310 K ausgehend von den Daten von von König (2003) mit Hilfe der Beziehung  $\ln K = -\Delta G_0/RT$

<sup>g</sup> Keine Werte verfügbar

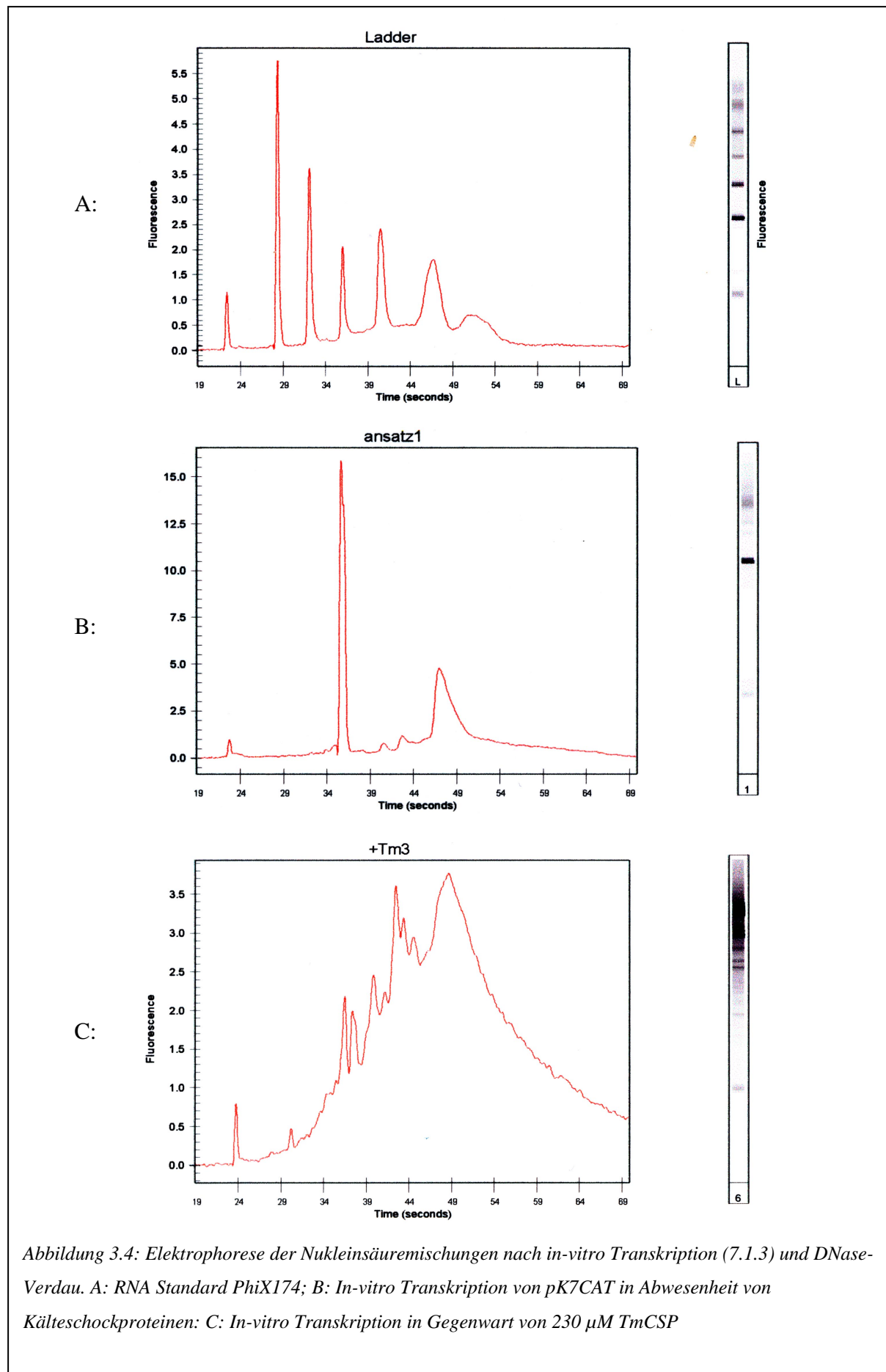
<sup>h</sup> K<sub>D</sub> für die Bindung von (dT)<sub>7</sub> to BsCSP interpoliert auf 310 K ausgehend von den Daten von Lopez et al., 1999

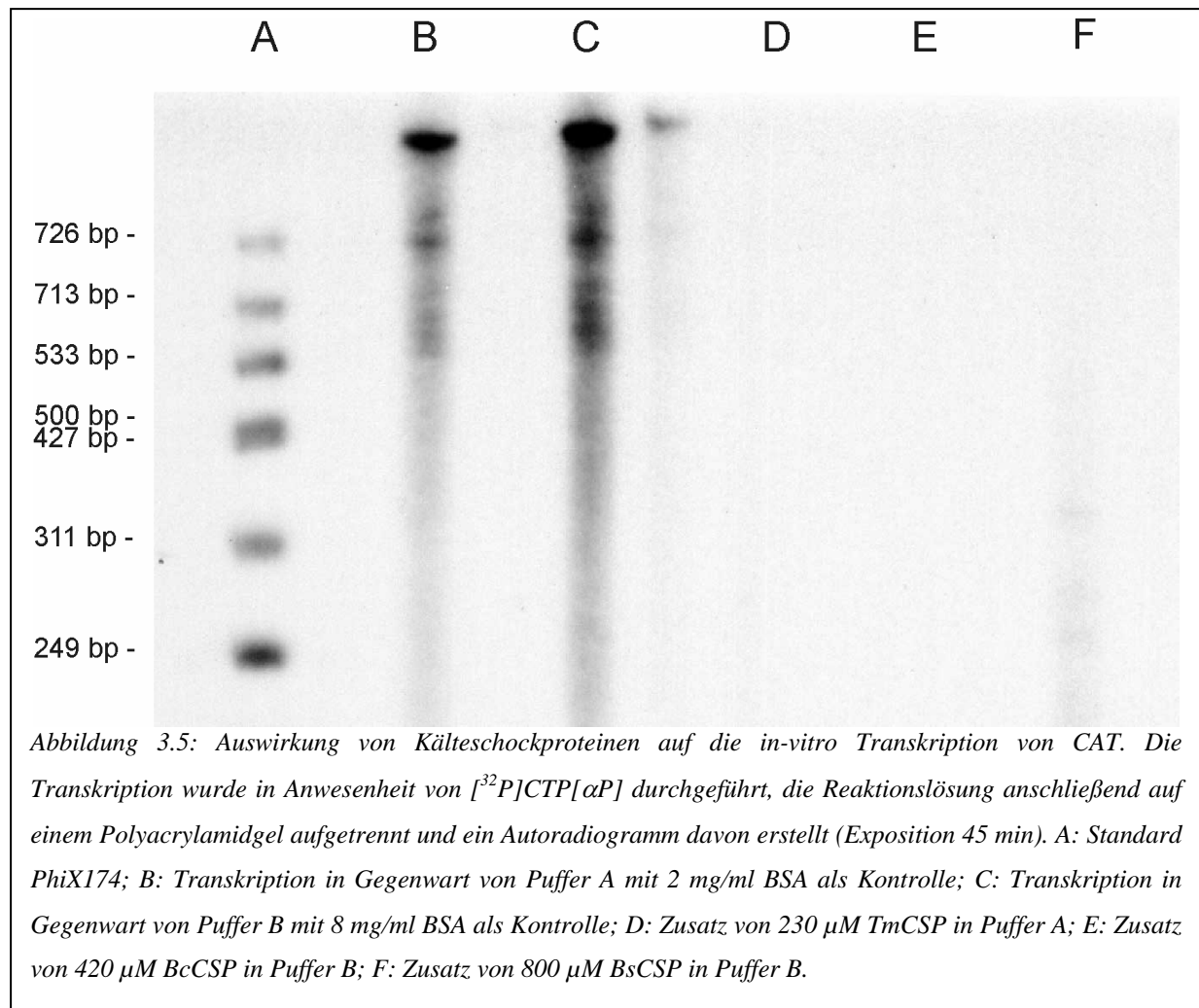
### 3.2.2 Inhibition der *in-vitro* Transkription durch Kälteschockproteine

Die unter 3.2.1 beschriebenen Effekte können auf verschiedene Art und Weise entstehen. So kann unter anderem entweder die Translation oder die Transkription gehemmt werden, weshalb es nötig ist, die einzelnen Reaktionen getrennt voneinander zu untersuchen. Die Translation kann als vom Rest der Zelle isolierter Prozess sehr leicht durch Verwendung eines *in-vitro* Transkriptionssystems untersucht werden (z.B. Riboprobe von Promega, Mannheim). Dabei werden Plasmide mit den Zielgenen unter dem Promotor der T7 RNA Polymerase verwendet, die von dieser in die entsprechende mRNA transkribiert werden. Im vorliegenden Fall wurden sowohl die Plasmide pK7 CAT als auch pET14b CAT (für Westernblot-Analytik) verwendet. Diese wurden für *in-vitro* Transkriptionsversuche in Gegenwart von verschiedenen Kälteschockproteinen in denselben Konzentrationen eingesetzt, die im gekoppelten System ausreichend für eine komplette Inhibition der Expression waren. Als Kontrollversuche dazu wurden die gleichen Mengen an BSA in dem jeweiligen Puffer eingesetzt. Nach der Transkriptionsreaktion wurden die Plasmide durch Verwendung der RQ1 RNase freien DNase abverdaut und die verbliebene RNA analysiert. Die Nukleinsäuren wurden zur Analyse der Zusammensetzung der Nukleinsäuremischung unter anderem auf einen AGILENT 2100 Bioanalyzer aufgetragen (siehe Abbildung 3.4).

Dabei konnte festgestellt werden, dass ohne Kälteschockproteine eine starke Bande an mRNA gebildet wird, während bei Zusatz von Kälteschockprotein diese Bande nicht erkennbar ist, sondern eine Verteilung an verschieden großen Fragmenten. Ob unter dieser Verteilung auch neu gebildete mRNA zu finden ist, wurde mit Hilfe von radioaktiver Markierung festgestellt. Hierbei wurde dem *in-vitro* Transkriptionsansatz [ $^{32}$ P]CTP[ $\alpha$ P] zugesetzt, um dieses in die mRNA einzubauen. Sollte eine Transkription in Gegenwart von Kälteschockproteinen stattfinden können, dann müsste diese *de novo* Synthese unter den anderen vorhandenen Nukleinsäuren auf einem Polyacrylamidgel mit anschließender Autoradiographie sichtbar werden.

Wie in Abbildung 3.5 sichtbar ist, werden bei Abwesenheit von Kälteschockprotein in den Kontrollreaktionen deutlich sichtbare Mengen an mRNA hergestellt. Jedoch ist bei Zugabe von CSP in hemmenden Mengen keine nennenswerte Menge an Transkription mehr zu beobachten. Aufgrund dieses Ergebnisses kann davon ausgegangen werden, dass der beobachtete Effekt bei der kombinierten Transkription/Translation zumindest auf einer Hemmung der Transkription beruht.





### 3.2.3 Auswirkungen von Kälteschockproteinen auf die *in-vitro* Translation

Da schon die *in-vitro* Transkription als eine von den nukleinsäurebindenden Kälteschockproteinen beeinflusste Reaktion identifiziert werden konnte (siehe 3.2.2), war auch die Translation auf Sensibilität bezüglich der Anwesenheit von CSPs hin zu untersuchen. Als Grundlage dazu wurde das etablierte System der kombinierten Transkription/Translation verwendet und nur die Komponenten, die für die Transkription essentiell sind, entfernt. So wurde keine T7 RNA Polymerase zugesetzt und das Lysat aus *E. coli* BL 21 hergestellt, der keine T7 RNA Polymerase im Genom trägt. Weiterhin wurde kein Plasmid, sondern die korrespondierende mRNA zugesetzt, die zuvor in einer präparativen *in-vitro* Transkription synthetisiert und anschließend aufgereinigt worden war (vergleiche 7.2.1.4).

Mit diesem System wurde CAT in Gegenwart und in Abwesenheit von vollständig hemmenden Konzentrationen an Kälteschockproteinen verschiedener Herkunft durchgeführt. Das Experiment wurde sowohl mit CAT ohne Tag durchgeführt (mRNA transkribiert von pK7 CAT) als auch mit His<sub>6</sub> markiertem CAT (mRNA synthetisiert ausgehend von pET14b CAT). Die unmarkierte CAT wurde über einen CAT-Assay nachgewiesen, die markierte über Westernblot mit  $\alpha$ -His Antikörper (Abbildung 3.6). Bei Einsatz von 33  $\mu$ g/ml mRNA konnten innerhalb einer Stunde 11  $\mu$ g/ml CAT synthetisiert werden. Wurden jedoch Kälteschockproteine zugesetzt, die in der gekoppelten Expressionsreaktion hemmende Wirkung gezeigt hatten, dann konnte keine Translation mehr detektiert werden, weder durch den gekoppelten Enzymtest (7.2.1.6) noch durch einen Westernblot (Insert Abbildung 3.6).

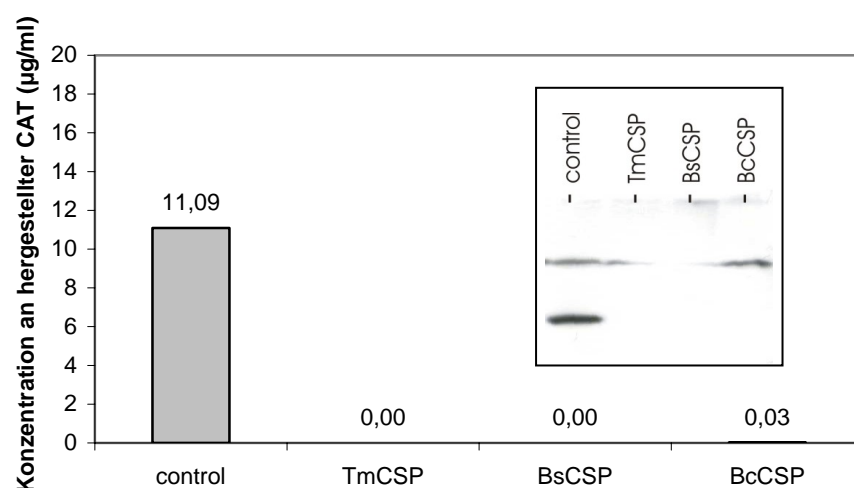
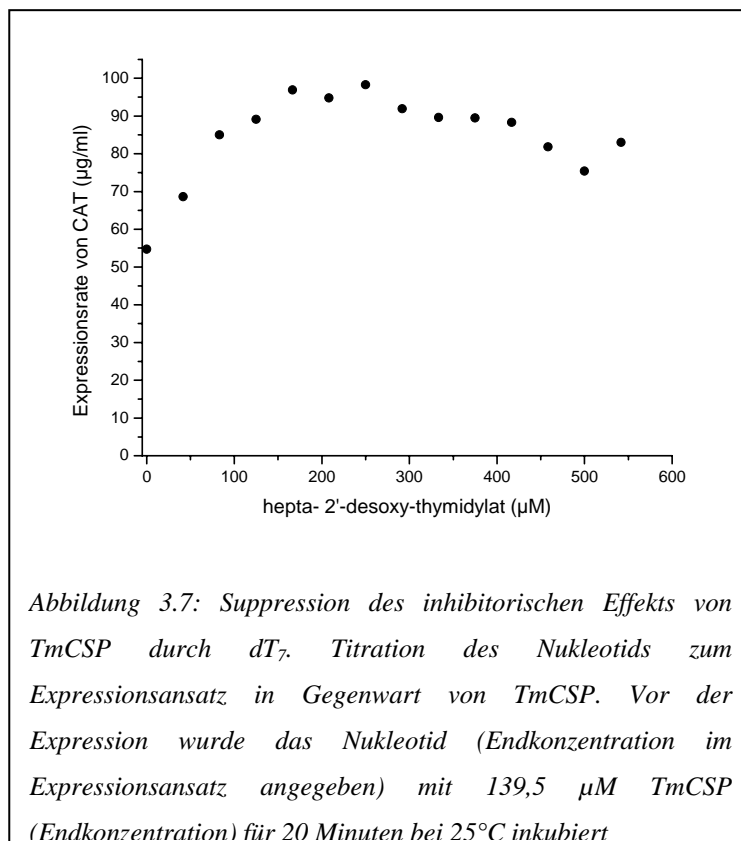


Abbildung 3.6: *In-vitro* Translation unter dem Einfluss von CSPs. Aktivitätstest nach 1 Stunde Reaktionsdauer ausgehend von mRNA transkribiert von pET14bCAT in Gegenwart von 8 mg/ml BSA (Kontrollansatz), 230  $\mu$ M TmCSP, 800  $\mu$ M BsCSP oder 420  $\mu$ M BcCSP (Insert: Westernblot der Ansätze mit Hisprobe (Santa Cruz, USA))



### 3.2.4 Umkehrung des Hemmeffekts durch kompetitive Bindung von Oligonukleotiden

Grund für die gezeigten Effekte ist die Maskierung der genetischen Information durch eine Interaktion der mRNA mit Kälteschockproteinen. Dies ist plausibel, da man von einer Bindungsaffinität von CSPs an ssRNA und ssDNA weiß (Jiang *et al.*, 1997, Lopez *et al.*, 1999 und 2000). Andererseits besteht die Möglichkeit, dass Nukleaseverunreinigungen in den Kälteschockproteinpräparationen zu einer verstärkten Degradation führen und dadurch die gezeigten Effekte entstehen. Dabei wäre die mRNA nicht mehr vorhanden. Wenn jedoch noch mRNA vorliegt, diese aber nur durch eine Bindung an Kälteschockproteine für die Translation unerreichbar ist, dann sollte eine Absättigung der Nukleinsäurebindungsstellen an den CSPs vor deren Zugabe zur zellfreien Expression eine Verringerung des Expressionsabfalls ergeben. Da bekannt war (von König 2003), dass das Oligonukleotid hepta-2'-desoxy-thymidylat (dT<sub>7</sub>) mit hoher Affinität an das Kälteschockprotein *TmCSP* bindet, wurde am Beispiel dieses Proteins exemplarisch eine Umkehrung des Hemmeffekts gezeigt. Dazu wurde die Menge an *TmCSP*, die ausreichend war für 50% Inhibition der kombinierten Transkription/Translation (Endkonzentration 139,5  $\mu$ M) mit verschiedenen Mengen an hepta-2'-desoxy-thymidylat für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Damit war es möglich, dass ein Teil des Kälteschockproteins das Nukleotid binden und dadurch keinen Effekt mehr auf die Expression ausüben konnte. Danach wurden diese Lösungen in



den Batchansatz der zellfreien Expression (7.2.1.3) eingesetzt und die Expressionsfähigkeit von CAT bestimmt (siehe Abbildung 3.7). Es wurde sichtbar, dass bei steigenden Konzentrationen von Oligonukleotid im Ansatz die Expressionsmenge wieder ansteigt, sodass sie sich bei ca. 200  $\mu$ M wieder an das Ausgangsniveau der normalen Zellfreiexpression ohne Zusatz von Kälteschockprotein angenähert hat.

### 3.3 Diskussion

Bei der zellfreien Proteinexpression existiert das große systembedingte Problem der unterschiedlichen Geschwindigkeiten von Transkription und Translation. Im lebenden Organismus, im hier behandelten Fall *E. coli*, sind die Geschwindigkeiten von RNA-Polymerase und ribosomaler Proteinsynthese aufeinander abgestimmt. Die transkribierte RNA wird noch während der Entstehung von ribosomalen Komplexen gebunden und translatiert. Dies geschieht pro mRNA mehrmals, sodass sogenannte Polysomen entstehen, wie sie aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen bekannt sind. In der lebenden Zelle existiert also eine hochkoordinierte Kopplung zwischen Transkription und Translation. Im modernen zellfreien System ist diese Kopplung wegen der Anwendung viraler Polymerasen nicht mehr vorhanden. Sie werden verwendet, weil die endogene RNA Polymerase zu wenig RNA produziert und eventuell noch vorliegende zelluläre Gene transkribieren kann, was die Ausbeute an Zielprotein schmälern würde. Moderne Systeme greifen deshalb auf virale Polymerasen zurück, zum Beispiel auf die T7 RNA Polymerase. Vorteilhaft dabei ist die hohe Spezifität auf den T7 Promotor, der gleichzeitig einer der stärksten bekannten Promotoren ist. Es wird ausschließlich das Gen des Zielproteins unter diesem Promotor transkribiert, und zwar wegen der enormen Prozessivität so viel, dass der nie ganz zu verhindernde RNase Abbau keine Beeinträchtigung mehr darstellt. Aufgrund der nicht mehr vorhandenen Kopplung von Transkription und Translation entstehen große Mengen an mRNA, die nicht unmittelbar von Ribosomen aufgegriffen werden. Diese frei vorliegende mRNA faltet sich in ihre thermodynamisch optimale Form durch Ausbildung von Sekundärstrukturen in Form von intramolekularen Basenpaarungen. Dadurch können vor allem regulatorische Sequenzen, zum Beispiel die Shine-Dalgarno-Sequenz, nicht mehr erkannt werden. Die thermodynamische Stabilisierung kann beim Vergleich zweier mRNAs desselben Zielproteins, nur mit verschiedener Verwendung von Codontripletts, nicht zu vernachlässigende Ausmaße annehmen. Bei den mRNAs von natürlichem und synthetischem Ras zum Beispiel kann eine Destabilisierung von 245 KJ/ mol (berechnet mit MFOLD (Zuker *et al.*, 1981)) durch Einführung gezielter Änderungen in der Basensequenz erfolgen (siehe Anhang). Die Auswirkung dieser Destabilisierung ist deutlich in Abbildung 3.1 zu sehen: Das synthetische Gen kann mit hoher Effizienz exprimiert werden, wohingegen das natürliche Gen im coomassiegefärbten Gel in keiner deutlichen Proteinbande resultiert.

Das beschriebene Problem der zellfreien Transkription/Translation ist sehr ähnlich dem Zustand lebender Zellen, die einen Kälteschock erleiden. Beim Absinken der Umgebungstemperatur nimmt nämlich die Stabilität von Wasserstoffbrückenbindungen bei der Interaktion komplementärer Basen zu, wodurch sich auch in der lebenden Zelle vermehrt mRNA-Haarnadelschleifen bilden und Shine-Dalgarno-Sequenzen unzugänglich werden.

Kälteschockproteinen wird nun in genau dieser Situation zugeschrieben, dass sie als einzelstrangnukleotidbindende Proteine Sekundärstrukturen entwinden und die Translation ermöglichen können (Brandi *et al.*, 1996). Im Gegensatz dazu steht die Vermutung, dass CSPs direkt die Translation ähnlich Y-Box-Proteinen in höherer Konzentration inhibieren (Ermolenko *et al.*, 2002). Ziel dieser Studie war es, analog zu dem von Ermolenko *et al.*, 2002 vorgeschlagenen Experiment im zellfreien System zu untersuchen, ob CSPs aktivierend oder inhibierend auf die Expression einwirken können. Der Hintergrund dieses Experiments war neben der Untersuchung der unklaren Funktion der Kälteschockproteine auch die Absicht, das System der Zellfreiexpression zu verbessern. Aus diesem Grunde konnte die Temperatur nicht variiert werden, wie von Ermolenko *et al.*, 2002 gefordert. Deshalb wurden Kälteschockproteine von Organismen verschiedener Wachstumstemperaturoptima eingesetzt, wodurch verschieden starke Bindungen zu erwarten waren.

Um jedoch nur die Effekte von CSPs auf die Expression beobachten zu können, wurden S30 Lysate eingesetzt, bei denen genau darauf geachtet wurde, dass während der Präparation keine Kälteschockbedingungen vorherrschten.

### 3.3.1 Effekte von CSPs bei der kombinierten Transkription/Translation

Im Rahmen der hier vorgestellten Studie wurden Kälteschockproteine verschiedener Organismen verwendet. Dies ist möglich, da die Kälteschockproteine eine weit verbreitete Gruppe von Proteinen darstellen, deren Homologie untereinander sehr hoch ist. Deshalb kann in bakteriellen Systemen davon ausgegangen werden, dass die Kälteschockproteine verschiedener Organismen dieselbe zelluläre Funktion übernehmen. Es wurden dazu die CSPs aus *Thermotoga maritima*, *Bacillus caldolyticus* und *Bacillus subtilis* verwendet. Bei diesen drei Proteinen wurde die strukturelle Ähnlichkeit durch Aufklärung der Proteinstrukturen bestätigt (Newkirk *et al.*, 1994, Schnuchel *et al.*, 1993, Kremer *et al.*, 2001, Mueller *et al.*, 2000). Weiterhin kann durch diese drei Proteine ein großer Bereich in den zu erwartenden Bindungsaffinitäten und damit in den zu erwartenden Auswirkungen abgedeckt werden, und

zwar aufgrund der stark unterschiedlichen Wachstumstemperaturen der Quellorganismen (siehe Tabelle 1). Dies bedingt, dass bei einer Reaktionstemperatur von 37°C das CSP aus *Bacillus subtilis* ca. 20°C über der Temperatur vorliegt, bei der der Organismus einen Kälteschock erleidet, während das Protein aus *Bacillus caldolyticus* bei der Temperatur ist, wo der Kälteschock für den Organismus einsetzt und für *TmCSP* die Temperatur bereits um ca. 25°C unterhalb des Einsetzens des Kälteschocks liegt.

Wie in Abbildung 3.3 sichtbar, bewirkt die Titration aller drei Kälteschockproteine zu der *in-vitro* Transkription/Translation einen konzentrationsabhängigen Abfall der Expressionsrate. *TmCSP* zeigt den Effekt als erstes, gefolgt von *BcCSP*. Mit ca. 800 µM benötigt schließlich *BsCSP* zur Hemmung die höchste Konzentration. Diese Reihung der wirksamen Konzentrationen in der zellfreien Expression stimmt mit der Reihung der Wachstumstemperaturoptima der Organismen überein. Weiterhin kann davon ausgegangen werden, dass die beobachteten Effekte in physiologischen Konzentrationsbereichen liegen, da bereits gezeigt wurde, dass CSPs während des Kälteschocks intrazellulär millimolare Konzentrationen erreichen können (Brandi *et al.*, 1999, Gualerzi *et al.*, 2003).

Aufgrund dieser Daten lässt sich die in der Literatur aufgeworfene Frage (Ermolenko *et al.*, 2002) beantworten, ob Kälteschockproteine als RNA Chaperone die Translation stimulieren oder in hohen Konzentrationen als hemmende Translationsfaktoren wirken. Man kann davon ausgehen, dass CSPs für manche Gene, vor allem wenn sie in ihrer 5' UTR eine so genannte „cold shock box“ beinhalten, als RNA Chaperone wirken (Jiang *et al.*, 1997, Brandi *et al.*, 1996). Dadurch wird die Anzahl an Kälteschockproteinen und anderen in dieser Situation wichtigen Proteinen stark hochreguliert. Weiterhin kann mit den Ergebnissen in dieser Studie gezeigt werden, dass Gene ohne eine spezifische Sequenz bei höheren Konzentrationen an CSPs in ihrer Expression stark eingeschränkt werden. Dies kann dem Zweck dienen, dass während der Akklimationsphase die allgemeine Proteinsynthese stark reduziert wird, und die Zelle durch die Expression von Kälteschockproteinen und ähnlichen Proteinen Zeit hat, sich an die geänderten Umweltbedingungen anzupassen.

Um zweifelsfrei nachzuweisen, dass der hier gezeigte konzentrationsabhängige Expressionsabfall durch die Nukleotidbindung der Kälteschockproteine und nicht durch andere Faktoren bedingt ist, wurden in einem Kontrollexperiment die Bindungsstellen des Kälteschockproteins *TmCSP* mit verschiedenen Mengen des Oligonukleotids dT<sub>7</sub> abgesättigt (siehe Abbildung 3.7). Dieses Experiment war nur mit *TmCSP* möglich, da mit diesem Protein bereits ausführliche Bindungsstudien mit Nukleotiden durchgeführt worden sind (von König 2003). Die Bindungskonstante von *TmCSP* an dT<sub>7</sub> konnte mit 0,02 µM bei 37°C

angenähert werden (Markus Zeeb, Bayreuth, persönliche Mitteilung). Aufgrund dieser starken Bindung war es möglich, bei genügend hohen Konzentrationen an Nukleotid (ab ca. 150  $\mu\text{M}$  dT<sub>7</sub> bei 139,5  $\mu\text{M}$  TmCSP) die Nukleotidbindungsstellen des CSP zu besetzen und dadurch den Hemmeffekt aufzuheben. Diese Daten lassen auf eine äquimolare Bindungsstöchiometrie zwischen TmCSP und dT<sub>7</sub> schließen.

### 3.3.2 Auswirkungen von Kälteschockproteinen auf die Transkription

Nachdem dieser deutliche Effekt der Expressionshemmung im gekoppelten Transkriptions/Translationssystem beschrieben ist, stellt sich die Frage, auf welchen der einzelnen Teilschritte der Proteinsynthese die CSPs einen Einfluss ausüben können. Um die Transkription isoliert betrachten zu können, wurde ein *in-vitro* Transkriptionskit (Riboprobe, Promega) verwendet und während der Transkriptionsreaktion wurden die Kälteschockproteine aus *Thermotoga maritima*, *Bacillus caldolyticus* oder *Bacillus subtilis* zugesetzt. Die Auswirkungen dabei wurden durch Analytik der entstandenen RNA untersucht. Durch Verwendung des AGILENT 2100 Bioanalyzers konnte festgestellt werden, dass bei Anwesenheit von CSPs keine nennenswerten Mengen an mRNA hergestellt werden, wohingegen das Plasmid durch die RQ1 RNase freie DNase nicht so weit abgebaut werden kann wie in Abwesenheit von CSPs. Im Gegensatz dazu ist eine breite Verteilung verschieden großer Banden zu sehen, die die Reste eines partiellen Plasmidverdaus darstellen. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass keine mRNA abgelesen worden ist, da das Plasmid mit Kälteschockproteinen einen Komplex eingegangen ist, der eine Translation blockiert. Um entscheiden zu können, ob in Gegenwart von Kälteschockprotein in ausreichender Konzentration für eine Hemmung der Expression nicht doch geringe Mengen an mRNA gebildet werden, wurde ein radioaktiv markierter Transkriptionsansatz durchgeführt und die markierten Nukleinsäuren auf einem Polyacrylamidgel aufgetragen (Abbildung 3.5). Dabei wurde auf jede Spur dieselbe Menge an Radioaktivität aufgetragen. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in Gegenwart von CSPs keine mRNA mehr hergestellt wird, so wie sie in den Kontrollansätzen vorhanden ist. Man kann davon ausgehen, dass der physiologische Grund für die Inhibition der Transkription darin liegt, dass in der Akklimationsphase, in der sich das Proteinexpressionsmuster an die geänderten Umweltbedingungen anpasst, keine unnötige mRNA hergestellt wird. Es ist bekannt, dass die Stabilität der mRNA von CspA aus *E. coli* durch die Anwesenheit von Kälteschockproteinen extrem erhöht wird (Ermolenko *et*

*al.*, 2002). Aus diesem Grunde kann postuliert werden, dass dieser Transkriptionsstop bei allen Genen auftritt, da die einzigen Proteine, die in der Akklimationsphase hochreguliert werden, dies auf mRNA-Ebene über die Stabilität der RNA und nicht über eine Neusynthese bewerkstelligen.

### 3.3.3 Die Wirkung von Kälteschockproteinen auf die Translation

Die zweite Möglichkeit der Einflussnahme von Kälteschockproteinen auf die Expression besteht auf der Ebene der Translation. Um dies zu untersuchen, wurde das System der kombinierten Transkription/Translation modifiziert, sodass nur noch die Translation ablaufen konnte. Es wurde dazu exogene mRNA, jedoch kein Plasmid und keine T7-RNA Polymerase, verwendet. Wie in Abbildung 3.6 gezeigt, wird bei Applikation von Kälteschockproteinen die Translation von CAT vollständig blockiert. Die mRNA enthält keine „cold shock boxes“ (Jiang *et al.*, 1997, Brandi *et al.*, 1996) im Gegensatz zu den mRNAs der Kälteschockproteine und der Kälte toleranten Proteine (Gualerzi *et al.*, 2003). Ausgehend von diesen mRNAs konnte eine Erhöhung der Expressionsrate von CSPs und ähnlichen Proteinen festgestellt werden. Dieser Befund stimmt mit der RNA Chaperontheorie überein. Die hier beschriebenen Ergebnisse hingegen können auf die Expression von Haushaltsgenen übertragen werden. Demnach haben CSPs auf diese keine translationsverbessernde RNA Chaperonaktivität. Somit ergänzt die vorliegende Studie die Ergebnisse von Guilodori *et al.*, 2004 und trägt dazu bei, die Frage von Ermolenko *et al.*, 2002 zu beantworten, ob CSPs RNA Chaperone sind oder ob sie in hohen Konzentrationen inhibitorisch wirken. CSPs stimulieren also die Expression bestimmter Gene mit spezifischen Signalsequenzen, bei anderen Proteinen zeigt sich jedoch im zellfreien Modellsystem eine konzentrationsabhängige Inhibition der Expression. Diese Kombination erklärt sehr genau die Phänomene, die aus 2D-Gelelektrophoreseversuchen bekannt sind (Graumann *et al.*, 1996). Der Sinn hinter dieser differenzierten Expressionsänderung könnte darin liegen, der Zelle Zeit zu geben, um auf die veränderten Umweltbedingungen durch ein neues Proteinexpressionsmuster zu reagieren.

### 3.3.4 Bestimmung der apparenten Dissoziationskonstanten aus den vorliegenden Daten

Da der hier beschriebene Effekt der Kälteschockproteine in Bezug auf die Proteinexpression nicht auf einer Bindung an eine spezifische Sequenz beruht und damit keine RNA-Chaperonfunktion nachgewiesen werden konnte, muss von einer relativ unspezifischen Bindung der Kälteschockproteine an die Nukleinsäuren ausgegangen werden. Mit Hilfe der in dieser Studie erhaltenen Daten ist es unter bestimmten Annahmen möglich, die Bindungsaffinitäten der drei untersuchten Kälteschockproteine an eine nicht näher spezifizierte Nukleinsäure während des Expressionsgeschehens anzunähern. Es wurden dazu zwei verschiedene Modelle verwendet. Im einfacheren Modell wird nur die Transkription durch CSPs beeinflusst (Kapitel 7.3 Gleichung 1), also ist in diesem Modell die mRNA der limitierende Faktor. Damit kann der Abfall der Expression bereits sehr gut beschrieben werden, nicht jedoch der konstante Teil bei geringen Kälteschockproteinkonzentrationen. Denn bei gegen Null gehender CSP Konzentration sind bei der Zellfreiexpression noch viele andere Faktoren relevant, die in einem gegebenen System die Expression nach oben hin beschränken. Der bedeutendste Faktor hierbei ist die limitierte Anzahl an aktiv vorliegenden Ribosomen, die wie schon beschrieben, unter normalen Expressionsbedingungen die Expression so lange limitiert, bis die Anzahl der verfügbaren mRNA-Molekülen durch die Einflussnahme der Kälteschockproteine zu gering wird. Dieses Phänomen wurde bereits in Gleichung 1 behandelt. Aus diesem Grunde wird die dabei errechnete Menge an frei verfügbarer mRNA (als  $c_{\text{RNA}}^{\text{total}}$ ) in Gleichung 2 eingesetzt. Diese Gleichung nun kann die in Abbildung 3.3 enthaltenen Messwerte sehr gut mathematisch beschreiben. Die erhaltenen apparenten Bindungskonstanten (in Tabelle 1:  $K_{\text{app}}$ ) der drei Proteine befinden sich in plausiblen Bereichen. Zum einen entsprechen die relativen Verhältnisse der Bindungskonstanten der Natur der drei Proteine. So hat *TmCSP* die höchste Affinität, wie aus der hyperthermophilen Wachstumstemperatur des Organismus und aus der größten Steigung der Kurve zu erwarten war. *BcCSP* als Protein aus einem thermophilen Organismus nimmt wie erwartet die Mittelposition ein, gegenüber dem CSP aus dem mesophilen *Bacillus subtilis*. Diese Unterschiede in den Bindungsaffinitäten dieser ansonsten sehr hoch homologen Proteine können durch evolutionäre Anpassung im jeweiligen Organismus an die bevorzugten Habitate angesehen werden. Die Bindungsaffinitäten sind jedoch um ca. eine Größenordnung schwächer als die stärksten bekannten Wechselwirkungen dieser Proteine mit Oligonukleotiden spezifischer Sequenz. Bei *TmCSP* handelt es sich dabei um das oben (3.2.4)

beschriebene dT<sub>7</sub>. Diese verschiedenen Affinitäten können jetzt anhand der Daten dieser Studie in Kombination mit früheren Erkenntnissen, die zur RNA-Chaperontheorie geführt haben, kombiniert werden (Jiang *et al.*, 1997). Es ist plausibel, dass am Anfang des Kälteschocks, wenn noch deutlich weniger CSP in der Zelle vorhanden ist als im Rahmen dieser Studie eingesetzt wurde, CSPs auf bestimmte mRNAs translationsfördernd einwirken können. Diese Funktion scheint nur auf das Vorhandensein spezifischer Erkennungssequenzen limitiert zu sein, zum Beispiel der cold shock box im 159 Basen langem 5'UTR des CspA aus *E. coli*. An diese Motive binden die Kälteschockproteine schon bei geringerer Konzentration. Dadurch wird die Menge an Kälteschockprotein stark hochreguliert, sodass der Konzentrationsbereich an CSP erreicht wird, bei dem die hier beschriebenen Effekte eintreten. Man kann davon ausgehen, dass auf den Genen von Haushaltsproteinen viele Bindungsstellen geringerer Affinität liegen, die erst bei den hier verwendeten, aber auch in der Natur nachgewiesenen höheren Konzentrationsbereichen auftreten. Durch diese weniger spezifische Bindung wird dann der beschriebene Effekt der Expressionshemmung in der Zelle verursacht.



## 4 Anwendung von optimierten synthetischen Genen

### 4.1 Einleitung

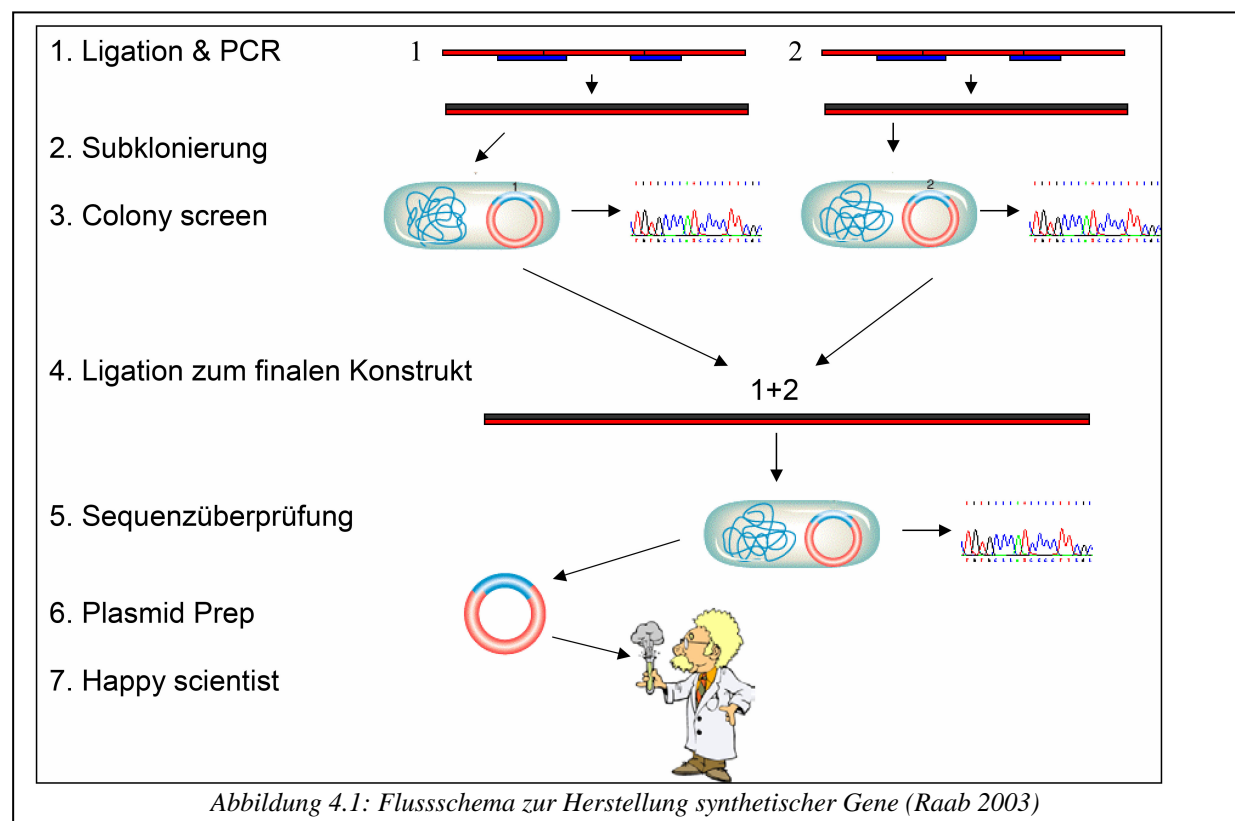
Wie bereits unter 3.2 dargelegt, können bei der Expression eines gewünschten Proteins aufgrund der Nukleotidsequenz des Gens Probleme auftreten, die die Effektivität des zellfreien Expressionssystems reduzieren können. Diese resultieren daraus, dass Proteine in einem heterologen System exprimiert werden. Die Ursprungsorganismen (meist eukaryotisch) weisen verschiedene gravierende Unterschiede im Vergleich zur Physiologie von *E. coli* auf, dem Organismus, der am häufigsten als Ausgangsorganismus für die zellfreie Expression Verwendung findet. Zu diesen Differenzen gehören zum einen die unterschiedliche Bevorzugung von bestimmten Codonen bedingt durch ihre unterschiedlichen tRNA Populationen und zum anderen die Existenz verschiedener regulatorischer Elemente, zum Beispiel Spleißstellen, repetitive Elemente oder auch ein verschiedener GC-Gehalt der jeweiligen Gensequenzen (Raab 2003), wodurch das Expressionsniveau eines Proteins moduliert werden kann. Manche Sequenzmotive sind für die Expression im Ursprungsorganismus von großer Bedeutung, bereiten jedoch Probleme bei der heterologen Expression nach der Klonierung in ein bakterielles Plasmid mit ganz verschiedener 5' UTR und 3' UTR, wodurch teilweise komplementäre Sequenzen entstehen können. Auf diese Weise können im System der kombinierten Transkription/Translation durch die Ausbildung von RNA Sekundärstrukturen regulatorische Sequenzen auf der frei vorliegenden mRNA für Initiationsfaktoren schwer erreichbar sein. Dadurch kann die Expressionsrate limitiert werden. Im Allgemeinen kann davon ausgegangen werden, dass mit einer mRNA, die wenig Sekundärstrukturen ausbilden kann, ein höheres Expressionsniveau erreicht werden kann als mit einer mRNA, die viele Haarnadelschleifen enthält. Um bei einem gegebenen Zielprotein eine optimale Expression zu erreichen, ist es deshalb nötig, die Basensequenz des interessierenden Gens zu verändern. Es sollte dabei eine Minimierung der Sekundärstrukturbildung bei gleichzeitiger Vermeidung inhibitorischer Sequenzmotive und Anpassung des GC-Gehalts unter Beibehaltung der Aminosäuresequenz des Zielproteins durchgeführt werden.

Um diese Optimierung zu realisieren, sind verschiedene Strategien denkbar. Zum einen kann durch gerichtete Mutagenese einzelner Codonen, also durch Einführung stiller Mutationen, schrittweise versucht werden, die Expressionsrate zu steigern. Als Entscheidungskriterium

dafür, welches Codon geändert werden soll, könnten Sekundärstrukturvorhersageprogramme wie zum Beispiel MFOLD (Zuker *et al.*, 1981) dienen. Dabei ist zu bedenken, dass diese Methode sehr zeitaufwendig ist, da für die Durchführung einer einzelnen ortsgerichteten Mutation mit anschließender Erfolgskontrolle mehrere Tage zu veranschlagen sind. Alternativ dazu könnten alle Nukleotide zum Beispiel durch eine fehlerbehaftete Polymerasekettenreaktion stochastisch durchmutiert werden. Dabei würden alle möglichen Kombinationen an Nukleotiden entstehen, jedoch würde nur ein sehr geringer Bruchteil davon dem Zielprotein entsprechen. Weiterhin entstehen dabei  $4^n$  verschiedene Sequenzen, wobei  $n$  die Länge des Gens in Nukleotiden darstellt. Bei einem Protein von nur 40 Aminosäuren Länge erhält man dadurch theoretische  $1,77 \cdot 10^{72}$  verschiedene Ansätze.

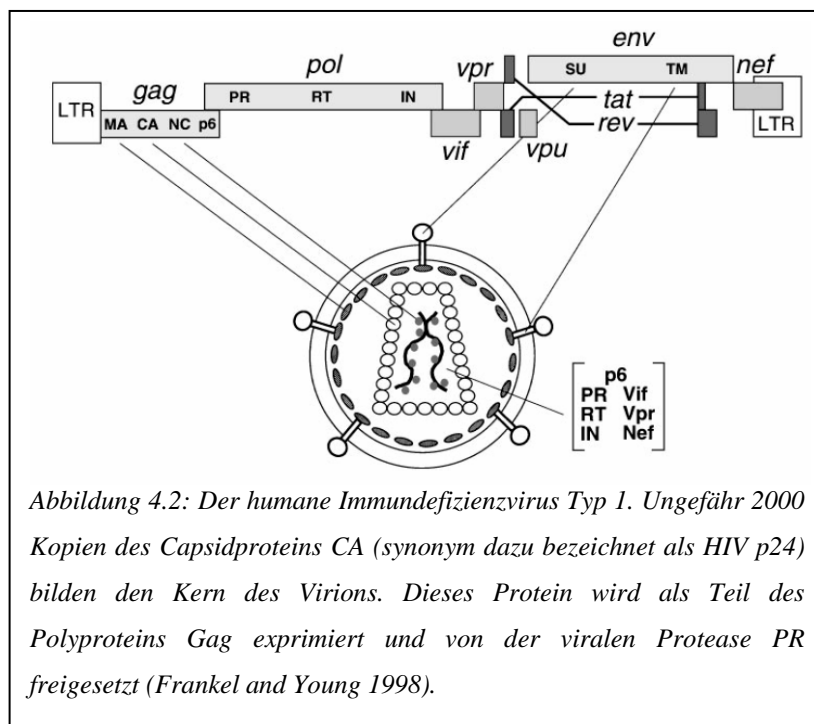
Eine sinnvolle Alternative dazu bietet die Methode der Gensynthese (siehe Abbildung 4.1).

Mit Hilfe einer randomisierten *de novo*-Synthese der benötigten Nukleotidsequenz wäre es möglich, die Anzahl zu überprüfenden Klone auf die mit der richtigen korrespondierenden Aminosäuresequenz zu beschränken. Bei einer Verwendung eines Proteins von nur 40



Aminosäuren Länge und der Erprobung von nur zwei Varianten jedes Codons wären trotzdem immer noch  $1,09 \cdot 10^{12}$  verschiedene Ansätze zu analysieren. Aus diesem Grunde ist es sinnvoll, eine zuvor auf theoretischer Ebene optimierte Sequenz zu generieren. Die kombinatorische Biologie stellt dazu mittlerweile Algorithmen zum rationellen Sequenzdesign zur Verfügung. Die vorliegende Arbeit hat sich deshalb zum Ziel gesetzt,

basierend auf einer Kooperation mit der Firma GENEART (Regensburg) und der Arbeitsgruppe Wagner (Universitätsklinik Regensburg), das Potential eines Optimierungsalgorithmus' bei der zellfreien Proteinexpression zu überprüfen. Die Optimierung der Plasmide wurde von GENEART durchgeführt, die Zellkulturanalysen mit dem hergestellten Protein übernahm die Arbeitsgruppe Wagner. Mit Hilfe des verwendeten Algorithmus (Raab 2003) wurden verschiedene synthetische Varianten des Capsidproteins p24 (siehe Abbildung 4.2) des humanen Immundefizienzvirus hergestellt. Die Varianten waren jeweils auf unterschiedliche Organismen hin optimiert. Das Protein p24 wurde ausgewählt, da es ein interessantes Ausgangsprotein bei der Entwicklung einer Diagnoseroutine für die Vakzinierung gegen die Krankheit AIDS darstellt. Dieses Protein



kann als Vorlage für weitere Proteine dienen, die dann ebenfalls zur Analytik einer bereits erfolgten Immunisierung herangezogen werden könnten. Weiterhin ist es theoretisch möglich, mit Hilfe dieses Proteins eine direkte Vakzinierung der Patienten zu erreichen. Die Existenz von p24 im infizierten Patienten wird bereits seit längerem

(Dowbenko *et al.*, 1985) in diagnostischen Routinen verwendet, um eine eventuelle HIV-Infektion nachzuweisen.

Im Rahmen dieses Projektes nun soll das Capsidprotein CA (synonym dazu bezeichnet als HIV p24) so modifiziert werden, dass es für eine Vakzinierung oder für den Nachweis einer bereits erfolgten Immunisierung des Patienten Verwendung finden kann.

Dieses Ziel soll durch Internalisierung des Capsidproteins erreicht werden. Durch das Proteasom soll dieses Antigen in der Zelle degradiert werden und durch MHC Klasse I Proteinkomplexe auf der Cytoplasmamembran von antigenpräsentierenden Zellen exponiert werden (Kim *et al.*, 1997). Dadurch werden diese Zellen vom Immunsystem als mit HIV-Proteinen infiziert erkannt, worauf eine entsprechende Reaktion unter Zuhilfenahme der

gebildeten Gedächtniszellen in Gang gesetzt wird. Damit wäre es möglich, die zelluläre Immunantwort eines Patienten zu erreichen. Desweiteren wird angestrebt, die Aufnahme und Präsentation der Chimäre in Zellkultur durchzuführen, um bei einer anschließenden Applikation eines Patientenserums analysieren zu können, ob dieser bereits Antikörper gegen das Antigen p24 gebildet hat.

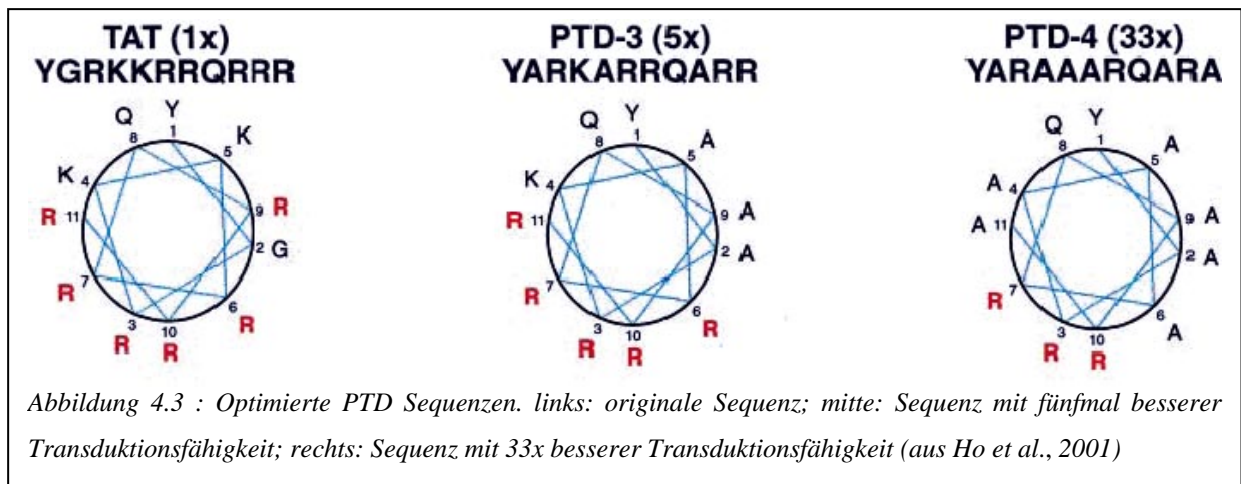
Um ein Protein dem MHC Klasse I Weg zuzuführen, muss es bereits in die Zelle gelangt sein. Um das zu erreichen, soll das CA Protein mit dem sogenannten *Tat*-Peptid markiert werden (vergleiche Shibagaki and Udey 2003, Kim *et al.*, 1997, Leifert *et al.*, 2003).

Dabei handelt es sich um eine kurze Domäne des HIV *tat* Proteins (Aminosäure 48 bis 60, Futaki *et al.*, 2003), dem zugeschrieben wird, dass es Substanzen über die Zellmembran hinweg transportieren kann. So wurde gezeigt, dass solche Proteintransduktionsdomänen (PTD) Polypeptide, Polynukleotide oder auch kleine Nanopartikel oder Liposomen (Console *et al.*, 2003; Vives 2003) durch die Membran befördern können. Aus diesem Grunde werden diese Domänen auch als CPPs („*Cell penetrating peptides*“, Gupta *et al.*, 2005) bezeichnet.

Das Protein *Tat* von HIV bindet an das „trans-acting response element“ (TAR) der viralen RNA (Frankel and Young 1998, Futaki *et al.*, 2003), wobei die Proteintransduktionsdomäne des Proteins keine Funktion hat, da der Virus bereits durch Membranfusion in die Zelle gelangt ist (Futaki *et al.*, 2003).

Der genaue Mechanismus der Transduktion ist jedoch noch nicht geklärt. Verschiedene Toxine, die bestimmte Transportwege über die Cytoplasmamembran inhibieren, konnten höchstens eine Verlangsamung der Internalisierung, jedoch keine vollständige Inhibition bewirken (Brooks *et al.*, 2005). Neben diesen möglichen Transportwegen konnte nachgewiesen werden, dass *Tat*-Fusionsproteine über caveoläre Endocytose (Fittipaldi *et al.*, 2003) in die Zelle gelangen können (Lundberg *et al.*, 2003, Vives 2003). Desweiteren wurde postuliert, dass im sogenannten Teppichmodell (Pouny *et al.*, 1992) die Peptide mit ihrem geladenen Teil mit den Phospholipiden interagieren und bei einem Membranflip des Phospholipids internalisiert werden können. Alternativ dazu besteht die Möglichkeit, dass die amphipathischen Helices (Abbildung 4.3) eine Pore in der Membran bilden und dadurch eine Translokation ermöglichen können (Gazit *et al.*, 1994).

In weiterführenden Studien konnte durch Modifikationen der Sequenz das Transduktionspotential dieser Domäne stark erhöht werden (siehe Abbildung 4.3). Dabei wurde der amphipathische Charakter dieser  $\alpha$ -helikalen Struktur durch die Verwendung von Strukturvorhersageprogrammen verstärkt. Geladene Argininreste liegen den ungeladenen Alaninen direkt gegenüber. Die im Rahmen dieser Studie verwendete PTD Sequenz



(YARAAARQARA) hatte dadurch (Ho *et al.*, 2001) eine um den Faktor 33 höhere Transduktionsfähigkeit als die im Virus vorkommende Sequenz. Bei über 50 verschiedenen Chimären zwischen gewünschtem Protein und *Tat*-Peptid konnte inzwischen eine Internalisierung nachgewiesen werden (Vives 2003). Aus diesem Grunde wurde diese optimierte Domäne an p24 angefügt, um so eine Aufnahme in die antigenpräsentierenden Zellen zu bewirken (analog Shibagaki *et al.*, 2003).

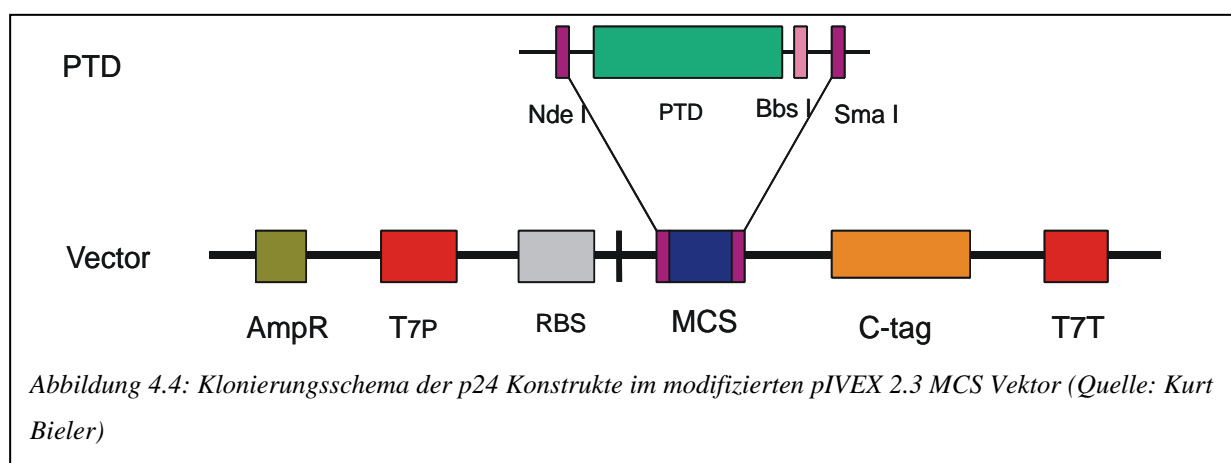
Um für die Aufnahme des p24 in die Zelle ein optimales Fusionsprotein zu finden, sind verschiedene Konstrukte mit unterschiedlicher Lokalisation der PTD entwickelt worden. Diese sollten nun zellfrei exprimiert werden, um dadurch den Einfluss der PTD und bei ausgewählten Konstrukten die Auswirkung der Sequenzoptimierung auf die Expressionsrate zu bestimmen. Desweiteren waren *Tat*-markierte Fusionsproteine aus GFP (grün fluoreszierendes Protein) und p24 hergestellt worden, um über Fluoreszenzmikroskopie die Aufnahme in die Zellen verfolgen zu können. Um diese Aufnahme zu erleichtern, wurde eine Kernlokalisationssequenz angefügt, damit sich diese Chimären im Kern ansammeln und dadurch auch bei geringen Konzentrationen bereits im Mikroskop sichtbar werden. Damit kann eine Chimäre gefunden werden, die wegen der Eigenschaften der PTD für eine Diagnoseprozedur der HIV-Immunisierung einsetzbar ist. Bei erfolgreichem Verlauf dieser Strategie ist es möglich, auch andere Proteine, zum Beispiel *env* (analog dazu mit PTD versehen), für diese Diagnose zu verwenden. Durch Verwendung einer Chimäre aus dieser optimierten *Tat*-PTD Sequenz und dem HIV-CA-Protein wäre es ebenfalls denkbar, einen Impfstoff herzustellen, der in fast alle Zellen leicht transduzierbar ist und eine sehr geringe Toxizität aufweist.

## 4.2 Ergebnisse

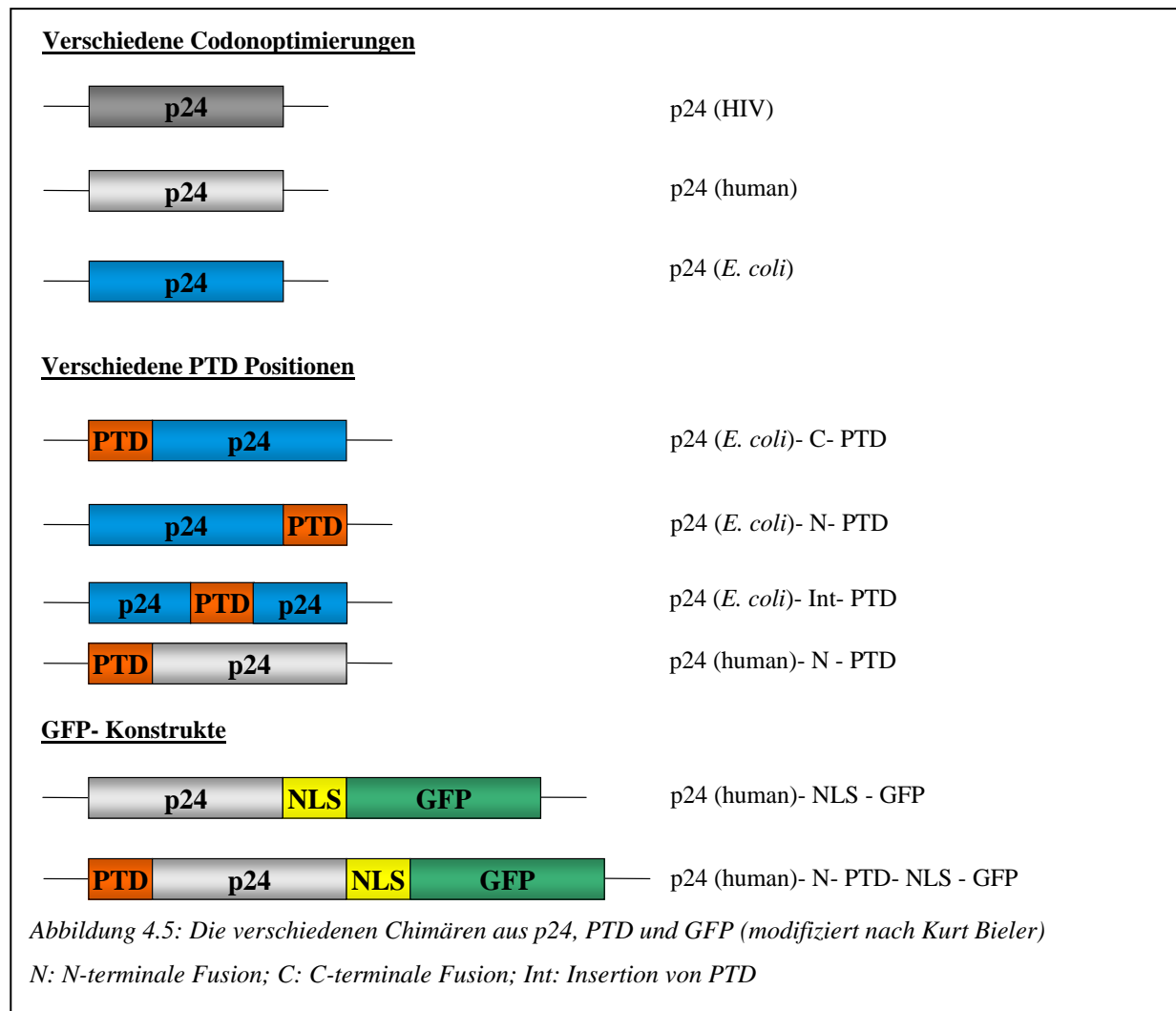
Das System der *in-vitro* Transkription/Translation kann nur dann eine optimale Produktivität erreichen, wenn das verwendete Gen bestimmten Bedingungen entspricht. Ein wesentlicher Grund, weshalb manche Proteine geringer exprimiert werden als andere, ist der Umstand, dass die Nukleotidsequenz des zu exprimierenden Gens nicht an das auf *E. coli* basierende Expressionssystem angepasst ist. Im Rahmen dieses Teilprojekts soll durch die Verwendung synthetisch optimierter Gene am Beispiel des Proteins HIV-p24 überprüft werden, ob eine Erhöhung der Expressionsrate im zellfreien System ermöglicht werden kann.

### 4.2.1 Die verwendeten Konstrukte

Neben der Möglichkeit, dass eine Anpassung der verwendeten Nukleotidsequenz an den Organismus *E. coli* eine Expressionssteigerung erbringt, war die Frage von Interesse, an welcher Position die PTD-Domäne des HIV-TAT Proteins bei der Konstruktion einer Chimäre mit dem p24 (HIV-CA Protein) eine optimale Expression bzw. eine optimale Transduktion in die antigenpräsentierenden Zellen bewirkt. Deshalb wurden in einen modifizierten Vektor pIVEX2.3 MCS (Roche, Aufbau siehe Abbildung 4.4) verschiedene Chimären aus p24, tat-Peptid und GFP ligiert.



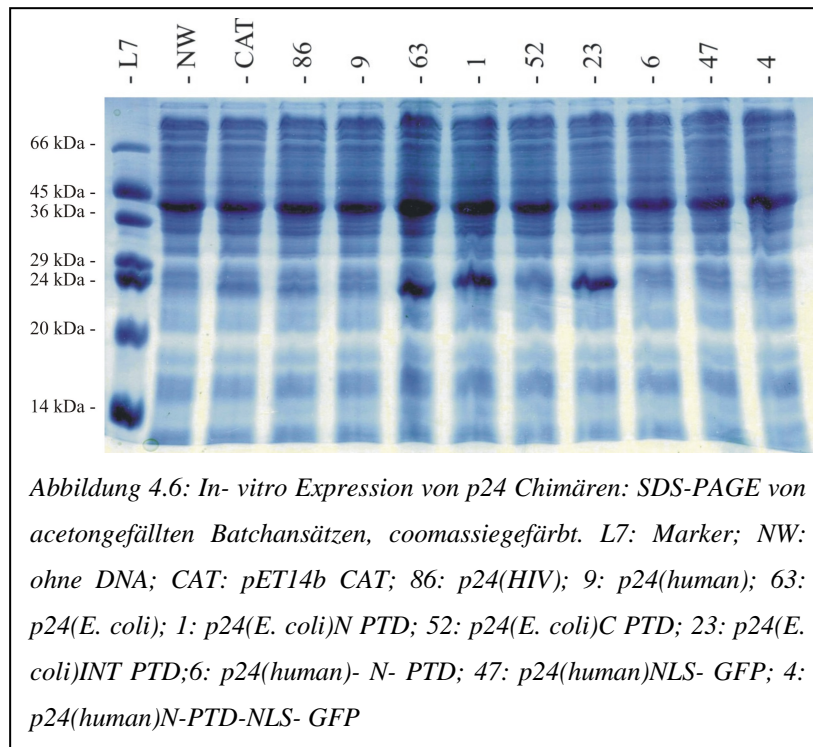
Im Einzelnen wurden die in Abbildung 4.5 dargelegten Konstrukte verwendet. Im Rahmen dieses Ensembles an Fusionsproteinen war es somit möglich, sowohl den Einfluss von Genoptimierungen im zellfreien Expressionssystem zu quantifizieren, als auch mit den gewonnenen Proteinen Aufnahmestudien an menschlichen Zellkulturen durchzuführen.



#### 4.2.2 *In-vitro* Expressionsstudien im auf *E. coli* basierenden System

Um feststellen zu können, in welchem Umfang die unter 4.5 beschriebenen Konstrukte in einer kombinierten Transkriptions/Translationsreaktion exprimiert werden können, wurden diese 9 verschiedenen Konstrukte in einer Batchreaktion (siehe 7.2.1.3) ohne RNase Inhibitor eingesetzt. Die Expression wurde für eine Stunde bei 37°C durchgeführt, die Reaktionslösung acetongefällt (7.2.3.3) und anschließend auf einem SDS Gel aufgetragen (Abbildung 4.6).

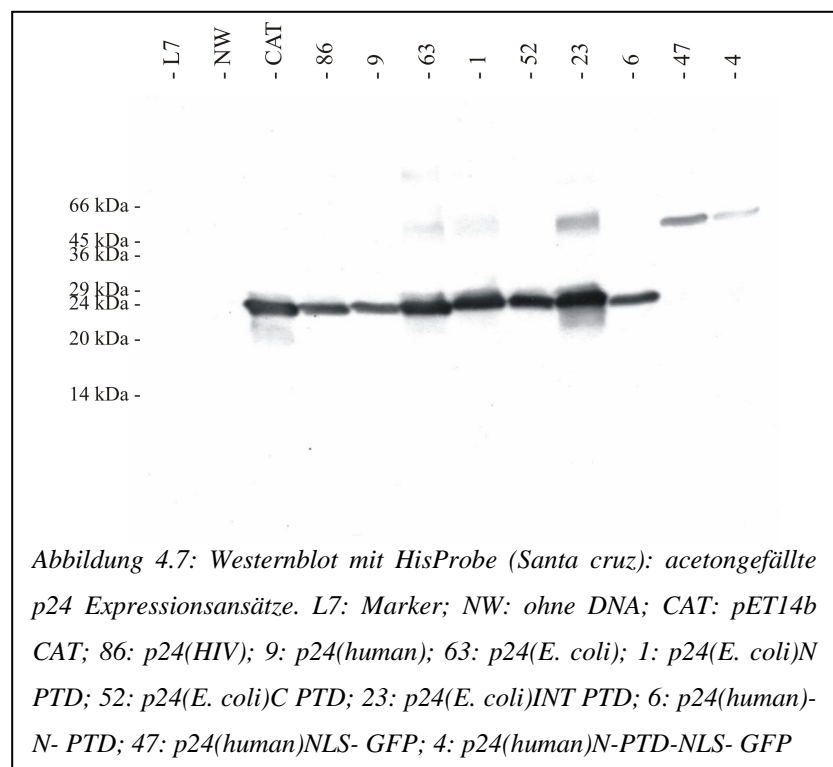
Es ist zu erkennen, dass die Konstrukte p24(*E. coli*), p24(*E. coli*)-N-PTD und p24(*E. coli*)-INT-PTD eine sehr prominente Expression aufweisen, vor allem im Vergleich zum Standardprotein, einer Variante der Chloramphenicolacetyltransferase mit His<sub>6</sub>-Tag. Bei diesem Protein konnte eine Expressionsrate von 88 µg/ml durch den Aktivitätstest der CAT nachgewiesen werden. Es müssen also von diesen Konstrukten mehr als ca. 100 µg/ml Protein in einer Stunde entstehen.



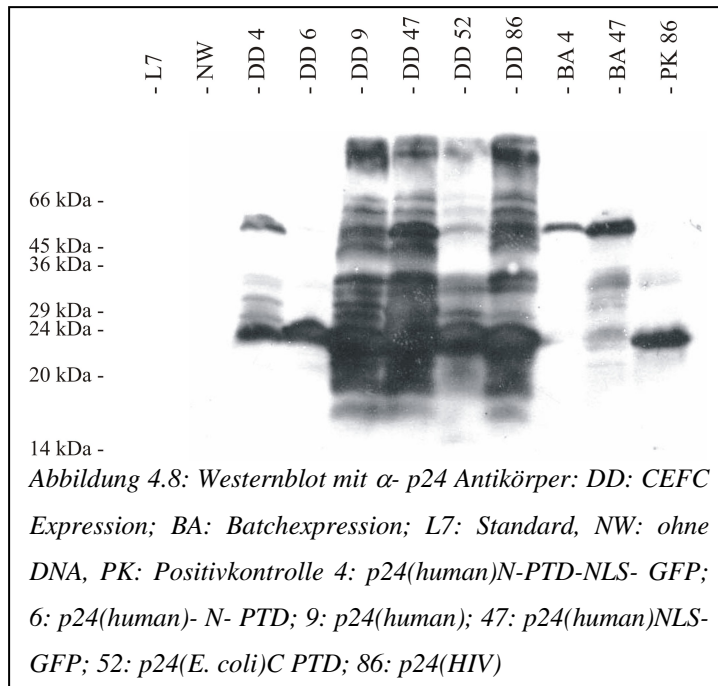
Auch die übrigen Proteine werden in der Expressionsreaktion hergestellt, wenn auch in geringerem Umfang, sodass sie auf dem coomassiegefärbten Gel gegenüber den Lysatproteinen nicht prominent hervortreten. Ihre Expression kann durch einen Westernblot mit einem gegen den His<sub>6</sub>-Tag der Plasmide gerichteten Antikörper nachgewiesen

werden. (Abbildung 4.7). Es kann festgehalten werden, dass alle Konstrukte ohne GFP in der gleichen Größenordnung wie CAT synthetisiert werden, die Fusionsprodukte mit GFP hingegen deutlich geringer.

Um die Menge an exprimiertem Protein zu erhöhen, wurde anschließend unter Verwendung der CEFC-Technik (7.2.1.5) die Expressionsdauer auf 20 Stunden erhöht. Die Reaktionslösung wurde analog zu dem Batchansatz ebenfalls gefällt und durch Westernblot (Abbildung 4.8) analysiert. Dabei konnte beobachtet werden, dass verglichen mit der Expression im Batchansatz bei der Expression mit dem CEFC-Verfahren sehr viel Aggregation und Proteolyse erfolgt. Bei diesem Westernblot wurde ein gegen das Protein p24 selbst gerichteter Antikörper verwendet, wodurch auch Fragmente, die keinen C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag

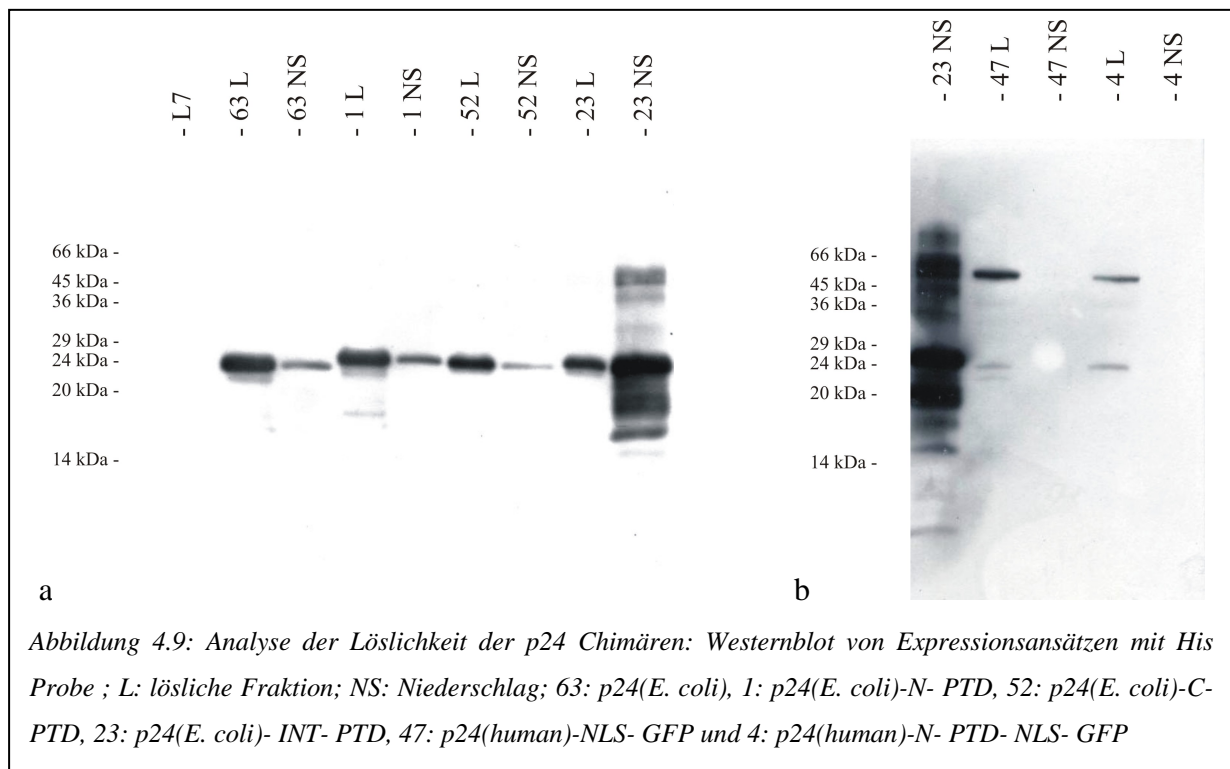


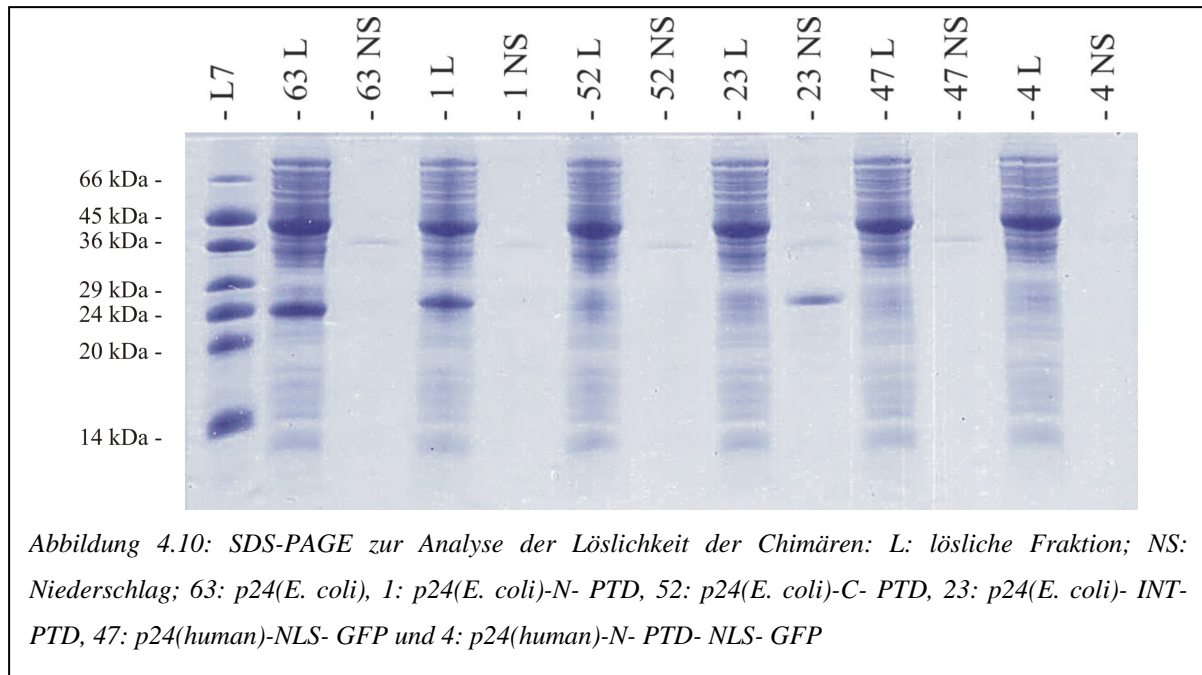




mehr tragen, nachgewiesen werden konnten. Beim gleichen Westernblot wurden Vergleichsansätze von Chimären, die in Batchansätzen exprimiert wurden, mit aufgetragen (Spuren BA 4 und BA 47). Diese Vergleichsmöglichkeit macht deutlich, dass im Batchansatz das Protein bedeutend stabiler vorliegt. Weiterhin wurde getestet, ob bei verwendeten Chimären Veränderungen in der korrekten Faltung des Capsid-

proteins p24 zu beobachten sind. Dazu wurde ihre Löslichkeit nach der Expression überprüft. Die in Abbildung 4.5 gezeigten Konstrukte wurden in 60  $\mu$ l großen Batchansätzen eingesetzt und nach einer Stunde Expression für 10 Minuten bei 160060 g und 4°C abzentrifugiert. Der jeweilige Überstand wurde getrennt vom Niederschlag acetongefällt und nebeneinander auf einem SDS-PAGE aufgetragen.





Es wurde jeweils ein Westernblot (Abbildung 4.9) mit HisProbe (SantaCruz, USA), einem gegen den His<sub>6</sub>-Tag gerichteten Antikörper, und ein coomassiegefärbtes Gel (Abbildung 4.10) durchgeführt.

Es ist zu erkennen, dass bei den meisten Experimenten in geringem Umfang auch unlösliches Protein entstanden ist, außer beim Konstrukt mit der internen PTD-Domäne. Bei diesem Konstrukt ist das Protein größtenteils ausgefallen. Jedoch existiert aufgrund der hohen Gesamtexpression dieses Konstrukts noch genügend Protein im Überstand, um eine Präparation dieser Chimäre sinnvoll durchzuführen.

#### 4.2.3 Vorbereitungen zur präparativen Expression

Für die Aufnahmeversuche wurden ca. 15 µmol jeder Chimäre benötigt, was bei einem Protein von 24kDa eine Gesamtmenge von 360 µg ergab. Um auch von den Konstrukten mit geringer Expressionsrate trotz der Aufreinigungsverluste noch ausreichend Protein isolieren zu können, wurde von allen Konstrukten ohne GFP ein Batchansatz von jeweils 10 ml durchgeführt. Die Konstrukte mit GFP wurden wegen des höheren Molekulargewichtes in Batchansätzen mit 20 ml Volumen exprimiert. Um nach einer erfolgten Aufreinigung eine Quantifizierung der Expressionsrate über die Menge an gereinigtem p24 durchführen zu können, mussten bei der Expression sämtliche Komponenten mit Einfluss auf die Expressionsrate dieselbe Qualität haben. Aus diesem Grunde war eine Lysatpräparation

unabdingbar, die eine ausreichend hohe Translationsrate ermöglichte, gleichzeitig aber so umfangreich war, dass damit alle nötigen Aufreinigungen durchgeführt werden konnten. In der vorliegenden Studie mit einem Batchansatzvolumen von 90 ml war deshalb ein Lysatvolumen von mindestens 33 ml notwendig. Für den Fall, dass die exprimierte Menge den Abschätzungen nicht entsprechen sollte, wäre diese Expression mit einem noch höheren Volumen zu wiederholen, wodurch bedeutend mehr Lysat notwendig werden würde. Damit waren Lysatpräparationen mit mehr als 50 ml Volumen herzustellen. Da bei einer Präparation, wie sie in unserem Labor etabliert war (Hofweber 2003), ein deutlich geringeres Volumen gewonnen werden konnte, musste die Lysatpräparationsmethode überarbeitet werden. Eine Erhöhung des Kulturvolumens konnte aufgrund der Limitationen durch die Zentrifugenkapazitäten nicht praktiziert werden, weshalb nach Alternativen gesucht werden musste. Die Erhöhung des resultierenden Lysatvolumens war daher nur durch Änderungen an zwei Stellen im Ablauf der Lysatpräparation möglich.

Üblicherweise wird der fertige S30 Extrakt (Weinfurtner 2003, Hofweber 2003) nach der Dialyse durch Kondensation gegen PEG 8000 (100% w/v) und durch Ultrafiltration kondensiert. So kann mit dem etablierten System ein Lysat gewonnen werden, welches typischerweise eine CAT-Expressionsrate von ca. 350  $\mu\text{g}/(\text{ml}\cdot\text{h})$  erreicht. Durch die Kondensation des Lysats wird jedoch das Volumen reduziert, wodurch ausgehend von ca. 15 g Zellen ca. 25 ml Lysat gewonnen werden könnte. Ohne Kondensation beträgt das Volumen des Lysats höchstens ca. 40 ml. Dieses Lysat erreicht aufgrund der geringeren Ribosomenkonzentration auch geringere Expressionsraten, typischerweise von ca. 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Da dieses Lysatvolumen für die geforderte Vergleichbarkeit von neun verschiedenen präparativen Batchansätzen nicht ausreicht, war eine weitere Erhöhung des Volumens notwendig. Dazu wurde beim Resuspendieren der Zellen das Aufschlussvolumen nicht wie etabliert verdoppelt (Hofweber 2003), sondern vervierfacht. Das daraus resultierende Lysat, welches im vorliegenden Fall verwendet wurde, hatte ein Volumen von ca. 75 ml und eine Expressionsrate von durchschnittlich  $237 \pm 24,9 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Mit diesem Lysat war es nun möglich, das Expressionsvorhaben unter vergleichbaren Bedingungen durchzuführen.

#### 4.2.4 Die präparativen Expressionen

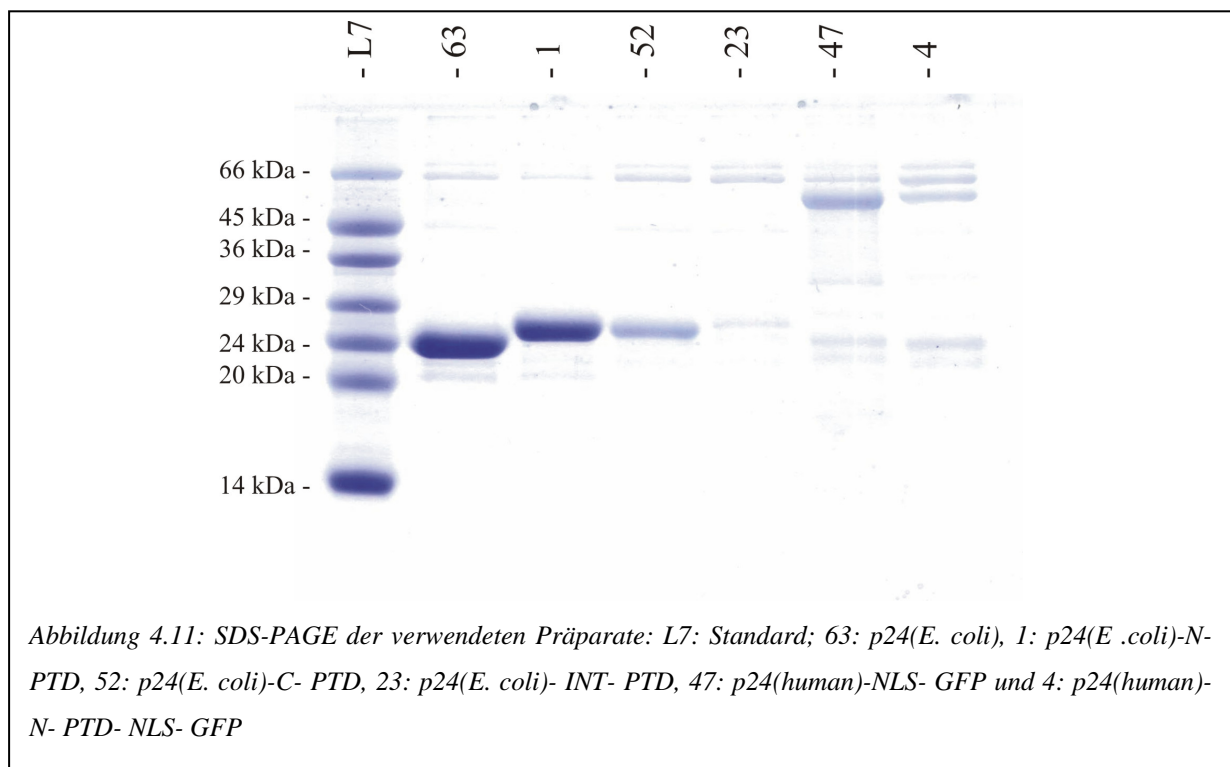
Die Zusammensetzung der *in-vitro* Transkriptions/Translationsreaktionen entsprach den Angaben im Methodenteil unter 7.2.1.3. Die Expression wurde für eine Stunde bei 37°C und 500 rpm im Thermomixer compact durchgeführt. Anschließend wurde die Reaktionslösung auf Eis gekühlt, ausgefallenes Protein durch Zentrifugation abgetrennt und das Capsidprotein

Protein	Expressionsrate in $\mu\text{g}/(\text{ml} \cdot \text{h})$
p24(HIV)	92,3
p24(human)	111
p24( <i>E.coli</i> )	332
p24( <i>E.coli</i> )N PTD:	400
p24( <i>E.coli</i> )C PTD:	118
p24( <i>E.coli</i> )INT PTD:	23
p24(human)NLS- GFP:	55,5
p24(human)N-PTD-NLS- GFP	10,6

Tabelle 2: Ermittelte Expressionsraten verschiedener p24 Chimären im etablierten *in-vitro* Expressionssystem

entsprechend der Anleitung in 7.2.3.1 aufgereinigt. Bei jedem Konstrukt wurden 5 ml neues Säulenmaterial NiNTA Superflow (Qiagen, Hilden) eingesetzt. Zusätzlich zu diesen Konstrukten wurde ebenfalls ein Expressionsansatz ohne Plasmid über eine NiNTA Chromatographie aufgereinigt. Damit konnten konstante Verunreinigungen bei

der Chromatographie subtrahiert werden. Die dadurch erhaltenen korrigierten Expressionsraten sind in Tabelle 2 dargestellt.



Damit wurden Präparate (Abbildung 4.11) folgender Konzentrationen hergestellt, die in Aufnahmestudien an menschlichen Zellen verwendet werden konnten:

Protein	Expressionsrate in µg/ml
p24( <i>E. coli</i> )	738
p24( <i>E. coli</i> )N PTD:	667
p24( <i>E. coli</i> )C PTD:	197
p24( <i>E. coli</i> )INT PTD:	51,1
p24(human)NLS-GFP:	555
p24(human)N-PTD-NLS-GFP	229

#### 4.2.5 Ergebnisse der Durchflusszytometrie der Aufnahme von PTD-p24 Chimären in menschliche Zellen

Um feststellen zu können, ob und in welchem Umfang die PTD-Domäne eine Aufnahme des p24 Proteins in Zellen bewerkstelligen kann, wurden von der Arbeitsgruppe Wagner 5 µg des jeweiligen Präparats auf 293 T Zellen gegeben und nach 2 Stunden mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Ergebnisse der intrazellulären und extrazellulären Analyse sind im Anhang dargelegt. Da die intrazelluläre Messung eine deutlich höhere Anzahl an granulären Zellen ergeben hat, kann festgestellt werden, dass bei Verwendung von fixierten Zellen eine PTD abhängige Aufnahme nachgewiesen werden konnte (Siehe Tabelle 3).

	intrazellulär	extrazellulär	Differenz
p24	7,9	1,1	6,8
p24 N-PTD	22,4	6,5	15,9
p24 C-PTD	13,4	1,9	11,5
p24 INT-PTD	0,4	0,1	0,3

Tabelle 3: Resultat der Durchflusszytometrie: Differenz der prozentualen Granularität der 293 T Zellen

Bei Verwendung der Chimären aus p24 und GFP konnte kein signifikanter Unterschied bei der Durchflusszytometrie festgestellt werden (Tabelle 4).

	% intrazelluläre Granularität
p24 NLS GFP	2,7
p24 NLS-PTD-GFP	3,0

Tabelle 4: Resultat der Durchflusszytometrie: Differenz der prozentualen Granularität der 293 T Zellen der GFP getagten Proteine

### 4.3 Diskussion

Die Methode der zellfreien Proteinexpression basierend auf *E. coli* ist für viele Problemstellungen äußerst ineffizient. Damit diese Methode für ein breiteres Spektrum von Proteinen genutzt werden kann, besteht die Möglichkeit, einerseits das System an das Protein, und andererseits das Protein den Gegebenheiten des auf *E. coli* basierten Expressionssystems anzupassen. Als Systemveränderung kann zum Beispiel der Zusatz von Detergentien, Reduktions- oder Oxidationsmitteln sowie Faltungshelfern wie Cofaktoren oder Chaperonen herangezogen werden.

Das Protein selbst kann nur in einem sehr geringen Rahmen verändert werden. Zum einen kann die Löslichkeit einer Aminosäuresequenz optimiert werden, indem an beiden Termini unstrukturierte Bereiche deletiert werden, sodass das verkürzte Konstrukt eine höhere Stabilität (sowohl thermodynamisch als auch proteolytisch) aufweist. Dieses Verfahren wird häufig zur Identifizierung geeigneter Konstrukte für Kristallisationsaufgaben verwendet (Jancarik *et al.*, 1988). Es wäre denkbar, dass dadurch eine höhere Konzentration des gewünschten Zielproteins im zellfreien Ansatz erreicht werden kann, jedoch ist eine so gravierende Änderung der Aminosäuresequenz meist nicht praktikabel. Denn häufig werden dabei Funktionen des Proteins verändert, welche für die weitere Verwendung essentiell sind.

Eine andere Möglichkeit, das Protein zu verändern, ist die Anpassung der Gensequenz an die Physiologie des Wirtsorganismus, im vorliegenden Fall an *E. coli*. Dies ist aufgrund des degenerierten genetischen Codes möglich, durch den unter Beibehaltung der Aminosäuresequenz die Nukleotidsequenz den Bedürfnissen angepasst werden kann. Dazu gehören neben dem artspezifischen GC-Gehalt die Anpassung an die verwendete tRNA Population durch Vermeidung selten vorkommender tRNAs. Dabei kommt es aber ganz wesentlich darauf an, die Anzahl der möglichen Sekundärstrukturen auf der transkribierten und frei vorliegenden mRNA möglichst gering zu halten. Wie in Kapitel 3 beschrieben, wäre dadurch die Initiation der Translation am wenigsten behindert. Somit ist zu erwarten, dass ein Gen, welches auf die beschriebenen Bedürfnisse hin optimiert ist, mit einer maximalen Expressionsrate im zellfreien Expressionssystem in das Zielprotein translatiert werden kann. Neben diesem auf *E. coli* hin optimierten Konstrukt wurde auch ein auf Säugerzellen hin optimiertes Konstrukt verwendet. Damit sollte festgestellt werden, ob Gene, die auf die Expression in Säugerzellen hin optimiert sind, auch im *E. coli* System gut exprimieren oder ob eine weitere spezifische Anpassung an *E. coli* sinnvoll ist.

#### 4.3.1 Die Auswahl der verwendeten Konstrukte

Um im Rahmen der Expression des HIV Capsidproteins einen Vergleich verschiedener Codonoptimierungen durchführen zu können, wurden von der Arbeitsgruppe Wagner (Universitätsklinik Regensburg) in Kooperation mit der Firma GENEART (Regensburg) verschieden optimierte Varianten des Gens dieses Proteins hergestellt. Dabei wurde neben dem Originalgen, wie es im Virus vorkommt, eine auf den menschlichen Organismus hin optimierte Version und eine auf die Physiologie von *E. coli* zugeschnittene Version synthetisch nach bioinformatischer Optimierung der Sequenz generiert. Diese Varianten sollten auf ihre Expressionsfähigkeit im zellfreien *E. coli* System hin untersucht werden. Die am besten exprimierende Version sollte danach mit einer optimierten PTD markiert werden. Durch die Fusion mit einem solchen CPP („*Cell penetrating peptide*“) wurde eine Möglichkeit geschaffen (Gupta *et al.*, 2005), das p24 in die Zelle zu bringen, damit eine Immunantwort des Patientenserums stattfinden kann. Aus diesem Grunde wurde neben einer auf *E. coli* hin optimierten Version auch eine auf Säugetiere hin optimierte Version mit einer N-terminalen PTD-Domäne des HIV-TAT Proteins versehen. Da schon bei den Chimären ohne PTD-Domäne deutlich wurde, dass die auf *E. coli* hin optimierte Version eine weit höhere Expressionsrate zur Folge hat, wurde diese Variante des p24 Proteins bei den weiteren Experimenten vernachlässigt, zumal das Protein selbst durch stille Mutationen nicht beeinflusst werden kann. Zur Klonierung der verschiedenen p24 / PTD Chimären fand der pIVEX 2.3 MCS (Roche, Mannheim) Verwendung, da dieser Vektor laut Hersteller auf die zellfreie Proteinexpression hin optimiert ist und zudem ein C-terminaler His<sub>6</sub>-Tag an die jeweils klonierte Chimäre angehängt wird. Dies trug zur Vereinfachung von Analytik und Aufreinigung der Proteine bei.

Da bekannt war (Jancarik *et al.*, 1988), dass eine unterschiedliche Lokalisation des TAT Peptids am Capsidprotein eine verschieden starke Transduktion der Chimäre über die Plasmamembran bewirkt, wurden verschiedene Chimären mit entweder N-terminaler, C-terminaler oder zentral lokalisierter PTD-Domäne verwendet. Dadurch konnte die Chimäre bestimmt werden, die die beste Kombination aus hoher Expressionsrate und hoher Transduktionsrate erzielen kann. Weiterhin wurden Chimären mit GFP hergestellt, um durch Lichtmikroskopie die Lokalisation des Proteins innerhalb der Zelle verfolgen zu können. Das Kernlokalisierungssignal (NLS) wurde an diese Proteine angehängt, damit im nichtfixierten Zustand eine eventuelle Aufnahme in die Zelle beobachtet werden konnte, da bei Existenz einer NLS das Protein sich im Kern konzentrieren sollte.

#### 4.3.2 Test der zellfreien Expression von p24 Chimären

Die verschiedenen Fusionsproteinkonstrukte wurden einem Batchansatz (7.2.1.3) einer zellfreien Transkriptions/Translationsreaktion unterzogen. Die Analytik der Expressionsmenge wurde durch SDS-PAGE und mittels Westernblot mit dem Antikörper „His-Probe“ (SantaCruz) durchgeführt. Diese Methoden wurden gewählt, da ein p24-ELISA (durchgeführt in der Arbeitsgruppe Wagner) keine in sich konsistenten Werte erbrachte. Dabei kam sowohl ein kommerziell verfügbares System als auch ein in der Arbeitsgruppe Wagner selbst etabliertes System zum Einsatz. Es kann verallgemeinernd festgestellt werden, dass die Quantifizierung mittels Antikörperreaktion in ihrer Absolutmenge nicht reproduzierbar durchgeführt werden konnte. Der Konzentrationsbereich schwankte zwischen einigen Milligramm pro Milliliter und wenigen Nanogramm pro Milliliter. Jedoch ergab die als Positivkontrolle parallel durchgeführte Expression eines Kontrollproteins (CAT) stets Konzentrationsmengen im Bereich von einigen Hundert Mikrogramm pro Milliliter. Dennoch kann festgestellt werden, dass trotz der hohen Absolutwertschwankung stets eine ähnliche Proportionalität zwischen den Konstrukten nachgewiesen werden konnte, ähnlich der, wie sie auf dem Westernblot (4.7) abschätzbar war. Theoretisch wäre durch diese hochspezifische Methode eine sehr genaue Quantifizierung der Expressionsrate möglich, aber aufgrund der nicht vorhandenen Reproduzierbarkeit war die Analytik der hergestellten Menge im Ansatz auf eine sehr grobe Abschätzung limitiert.

Dazu wurde auf einem Westernblot (4.7) das Kontrollprotein His<sub>6</sub>-getaggttes CAT mit aufgetragen und gefärbt. Denn bei diesem Klon kann durch einen CAT Assay festgestellt werden, wie viel an mit einem His<sub>6</sub>-Tag markiertem Protein hergestellt wurde. Damit kann über den Westernblot, auf dem sowohl dieses Konstrukt als auch die zu analysierenden Chimären aus PTD, p24 und GFP aufgetragen sind, die Größenordnung abgeschätzt werden, in der die Konstrukte im zellfreien Expressionssystem hergestellt werden.

Durch Analytik mit Polyacrylamidgel (Abbildung 4.6) und Westernblot (Abbildung 4.7) konnte festgestellt werden, dass die Konstrukte p24(*E. coli*), p24(*E. coli*)-N-PTD, p24(*E. coli*)-INT-PTD und p24(*E. coli*)-C-PTD in der gleichen Größenordnung hergestellt werden wie CAT.

Eine zunächst grobe Unterscheidung der graduellen Unterschiede zwischen den Expressionen kann ebenfalls vorgenommen werden. So ist bei den Proteinen ohne PTD zu erkennen, dass die originale und die auf Säuger hin optimierte Version relativ gleich gut exprimieren, und dass die auf *E. coli* optimierte Version deutlich stärker exprimiert. Bei den PTD-haltigen



Versionen der auf *E. coli* optimierten Variante ist gegenüber der Version ohne PTD nur bei der C-terminalen Lokalisation der PTD eine graduell geringere Expression sichtbar. Bei den Chimären ausgehend von der auf Säuger hin optimierten Sequenz ist durch N-terminale Fusion mit PTD keine gravierende Änderung zu erkennen. Hängt man an dieses Konstrukt jedoch noch GFP an, wird die Expressionsrate deutlich verringert.

Da mit dieser Methode naturgemäß nur eine sehr geringe Genauigkeit der Quantifizierung erreicht werden konnte, wurde eine Quantifizierung der exprimierten Proteinmenge mittels Bradford-Assay (7.2.3.8) nach erfolgter Aufreinigung beschlossen (Tabelle 2).

Eine Alternative zur bislang beschriebenen Methode der Expression im Batch wäre die Expression im kontinuierlichen Austauschreaktor der CEFC Technik. Dabei ist durch Verlängerung der Expressionszeit eine Erhöhung der Expressionsrate zu erwarten (Kigawa *et al.*, 1999). Diese Methode hat sich jedoch bei diesem Protein als nicht effektiv erwiesen, da zum einen auf dem SDS Gel (nicht gezeigt) keine Erhöhung der Zielproteinmenge, zum anderen aber sehr viel Aggregation der Proteine im Westernblot zu erkennen war (siehe Abbildung 4.8). Darum war es nötig, die Expressionsdauer bei einer Stunde zu belassen, innerhalb der keine signifikanten Aggregationsprobleme auftraten. Selbst bei dieser kurzen Expressionsdauer ist bei der p24 Chimäre mit der internen PTD-Domäne zu sehen, dass dieses Protein nicht löslich exprimiert wird. Diese PTD wurde mittig in das Protein eingefügt, wodurch möglicherweise ein Faltungsmotiv des Proteins verändert wurde, was zu der drastisch verschlechterten Löslichkeit führte (siehe Abbildung 4.9 und 4.10). Bei den übrigen Proteinen kann nach Trennung von Überstand und Niederschlag auf dem SDS Gel keine signifikante Menge an unlöslichem Protein festgestellt werden. Zwar sind geringe Spuren von missgefaltetem Protein nach der Expression im Niederschlag durch Westernblot nachweisbar (Abbildung 4.9), jedoch in so geringem Umfang, dass die Faltung dieser Proteine als ausreichend stabil für weitere Versuche angesehen werden kann. Um bei den schwächer exprimierenden Fusionsproteinen mit GFP ein eventuell im Niederschlag vorliegendes Protein nachweisen zu können, wurde der Westernblot für diese Chimären länger belichtet. Da dann aber die übrigen Banden bereits zu stark hervortreten, wie am Beispiel des Niederschlags von p24(*E. coli*)-INT-PTD sichtbar ist, wurde der Blot in zwei Teile aufgeteilt und verschieden starke Expositionen dargestellt. Bei den Konstrukten mit GFP kann damit auch bei längerer Exposition kaum ausgefallenes Protein nachgewiesen werden.

#### 4.3.3 Modifikationen des Expressionssystems für eine Großpräparation

Um im etablierten System große Mengen an His<sub>6</sub>-getagtem Protein herstellen und vor allem auch aufzureinigen zu können, waren verschiedene Änderungen am etablierten *E. coli* System vorzunehmen. Dazu zählt unter anderem die Entfernung des RNase Inhibitors. Dieser soll die Menge an mRNA durch eine Reduktion der RNase Aktivität auf einem hohen Niveau halten. Diese Funktion ist aber nur bei Expressionen interessant, die über längere Zeiträume hinweg durchgeführt werden. Da aufgrund der Aggregationstendenz der p24 Proteine (Abbildung 4.8) eine Expressionsdauer von nur einer Stunde gewählt wurde, konnte auf diesen Inhibitor verzichtet werden. Neben der Kostenreduktion hat dies zusätzlich den Vorteil, dass der His<sub>6</sub>-getaggte Inhibitor bei der Aufreinigung der Zielproteine nicht stören kann.

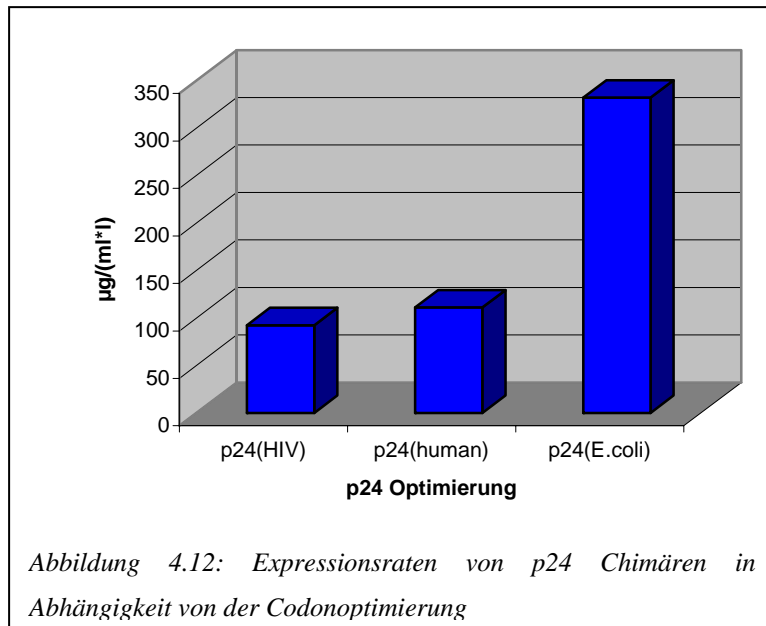
Die wichtigste Änderung im System bezieht sich auf die Präparationsprozedur des S30 Extraktes. Dabei wird, um ein möglichst umfangreiches Lysat hoher Aktivität zu erhalten, auf eine Kondensation des Lysats durch Filtration oder durch Dialyse gegen PEG 8000 verzichtet und stattdessen gegenüber der im Labor etablierten Methode das Aufschlussvolumen verdoppelt, wodurch die Proteinkonzentration im Lysat (bestimmt nach Bradford, 7.2.3.8) nicht verändert wird. Diese bleibt bei ca. 25 bis 27 mg/ml. Deshalb ist davon auszugehen, dass trotz der Verdünnung der Zellpaste um den Faktor 2 die Anzahl der Ribosomen im Lysat nicht verringert worden ist. Eine Erklärung dieses Phänomens könnte sein, dass durch den sehr schonenden Zellaufschluss mit kurzer Beschallungsdauer nur ein Bruchteil der vorhandenen Bakterien aufgeschlossen wird. Bei einer Verdünnung des Lysats muss der Aufschluss in doppelt so vielen Falcon Tubes durchgeführt werden, wodurch die gesamte Beschallungsdauer erhöht wird, wenn auch die einzelne Zelle durch das Verteilen auf verschiedene Gefäße nicht länger dem Ultraschall ausgesetzt ist. Damit kann also ein Lysat von ca. 80 ml hergestellt werden, welches in einer Stunde ca. 240 µg/ml CAT herstellen kann. Durch Ultrafiltration könnte dieses Lysat unter Volumenverlust zu einer höheren Expressionsfähigkeit aufkonzentriert werden. Da die Ultrafiltration jedoch in verschiedenen Konzentrationen ablaufen müsste, würden dabei verschiedene Aliquots unterschiedlicher Aktivität entstehen. Da dadurch die für diesen Versuch wichtige Vergleichbarkeit nicht mehr gegeben wäre, wurde diese nicht durchgeführt.

#### 4.3.4 Die präparativen Expressionen

Wenn spezifische Quantifizierungsmethoden, zum Beispiel ELISA, für ein Protein nicht verfügbar sind, kann eine Quantifizierung zum Beispiel durch Densitometrie oder auch durch radioaktive Markierung durchgeführt werden. Die Densitometrie hat den Nachteil, dass die Proteine auf dem SDS-PAGE prominent gegenüber den anderen Proteinen im Ansatz hervortreten müssen (Nemetz *et al.*, 2001), um die Fehlerrate des Verfahrens gering halten zu können. Bei Verwendung der Methode zur Quantifizierung über einen Westernblot ist es wahrscheinlich, dass aufgrund der vielen Inkubationsschritte und der komplexen Färbungsreaktion die Ungenauigkeit der Methode zunimmt. Aus diesem Grunde wurden SDS-PAGE und Westernblot (Abbildungen 4.6 und 4.7) nur dazu verwendet, die Größenordnung der Expression abzuschätzen. Zur Quantifizierung des Proteins nach der Aufreinigung wurde deshalb ein Bradford-Assay nach erfolgter Aufreinigung durchgeführt. Dabei muss beachtet werden, dass die Aufreinigung bei allen miteinander zu vergleichenden Proben gleich und so verlustarm wie möglich abläuft. Aus diesem Grunde ist eine Aufreinigung über den His<sub>6</sub>-Tag sehr geeignet. Die Aufreinigung über die Nickelaffinität ist sehr effektiv (94% Effektivität nach Roche RTS Application Manual) und hochspezifisch. Um das trotzdem vorhandene Problem der Verunreinigungsspuren auf ein Minimum zu reduzieren, wurde für jedes Konstrukt neues Säulenmaterial (NiNTA Superflow, Qiagen) verwendet. Weiterhin wurde aufgrund der unvermeidbaren Verunreinigungen, die konstant in allen Proben auftreten (siehe 4.11), ein Ansatz ohne DNA über NiNTA aufgereinigt und diese Proteinmenge von den anderen Expressionsmengen als konstante Verunreinigung abgezogen. Damit konnte ein Höchstmaß an Vergleichbarkeit erreicht werden.

#### 4.3.5 Die erhaltenen Expressionsraten

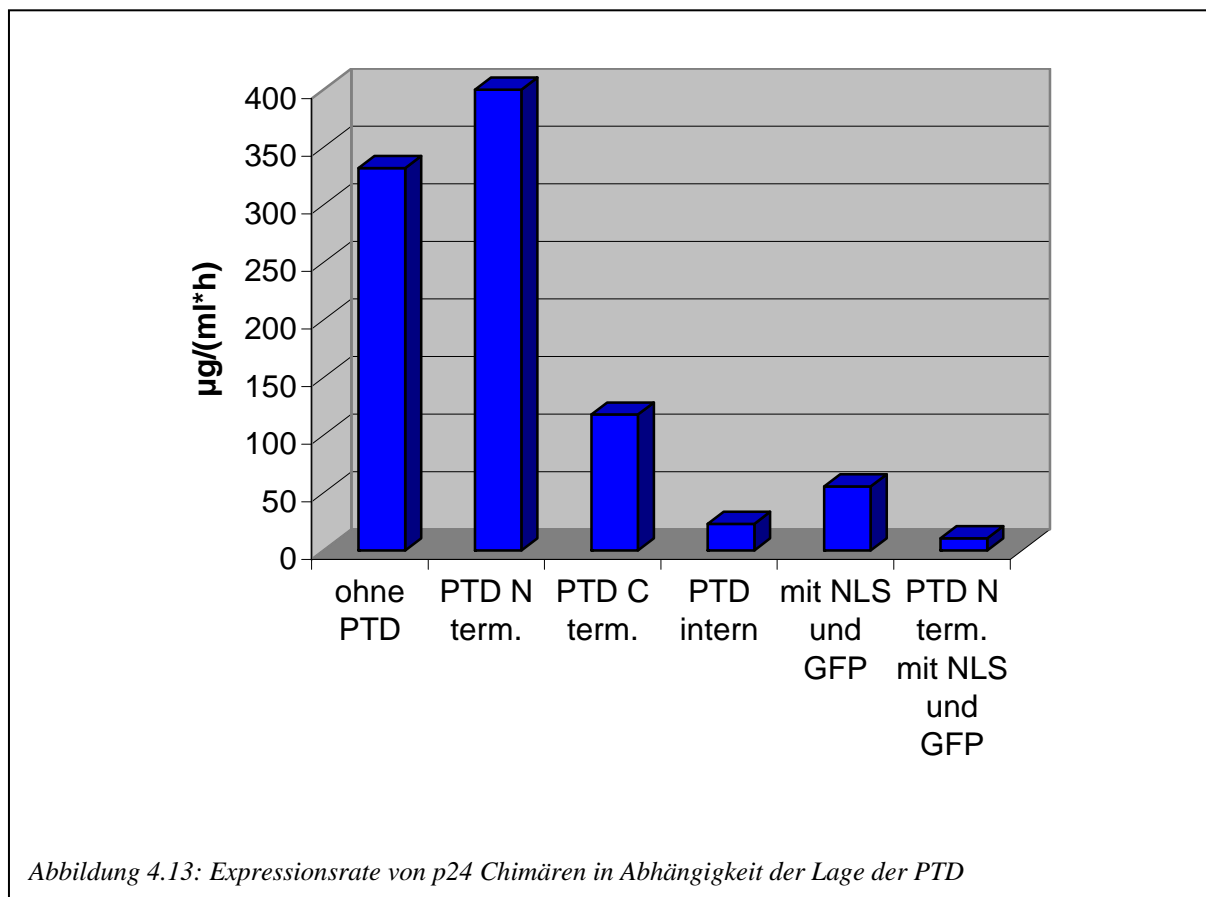
Die Expressionsraten, die durch Aufreinigung mit anschließender Proteinkonzentrationsmessung nach Bradford ermittelt wurden, sind in Abbildung 4.12 graphisch dargestellt. Dabei ist in Bezug auf die Optimierung durch stille Mutationen festzustellen, dass die Expressionsrate im zellfreien, auf *E. coli* basierenden System durch eine Optimierung auf die humane Physiologie eine Expressionssteigerung von 20,3 % erbringt, während durch eine Optimierung auf die *E. coli* Physiologie eine Steigerung von bemerkenswerten 259 % erreicht wird, was bedeutet, dass der Wert mehr als verdreifacht



wird. Die hierbei erreichte Expressionsrate von 332 µg/ml, gerechnet auf eine Stunde Expressionsdauer, stellt einen sehr hohen Wert im Vergleich zur Expression anderer Proteine dar. Es ist deswegen davon auszugehen, dass weitere Optimierungen am Protein nur noch geringe Expressionssteigerungen bewirken können. Durch die Optimierung der

Gensequenzen mittels des verwendeten Algorithmus ist deshalb nicht mehr das verwendete Protein für die Expressionsrate limitierend, sondern die Leistungsfähigkeit des Expressionssystems selbst.

Bei der Analyse des Einflusses der Lokalisation der PTD-Domäne (graphische Darstellung in Abbildung 4.13) kann festgestellt werden, dass eine N-terminale PTD-Domäne die Expression nicht stört, sondern sogar noch etwas erhöht. Bei der internen PTD kann nach



Abschätzung über Westernblot auch davon ausgegangen werden, jedoch ist der größte Teil des Proteins unlöslich. Es ist noch dazu wahrscheinlich, dass durch die getroffene Auswahl der PTD Lokalisation das Epitop, an welches der Antikörper beim ELISA-Test bindet, zerstört wurde. Jedenfalls ist kein p24 mit internem PTD über ELISA bestimmbar, obwohl genügend im Überstand vorhanden wäre. Die C-terminale Lokalisation des Peptids reduziert hingegen die Expressionsrate auf ca. 1/3 des Ausgangswertes. Ebenso erreichen die Chimären mit GFP im Vergleich zu denen ohne GFP nur sehr geringe Expressionsraten. Ein Grund dafür könnte sein, dass das Protein aufgrund seines hohen Molekulargewichtes wiederum neue Probleme bei der Expression im zellfreien System verursacht. Mit den hierbei erhaltenen Proteinproben ist es nun möglich, Aufnahmeversuche in menschlichen Zellkulturen durchzuführen.

#### 4.3.6 Aufnahme von PTD / p24 Chimären in 293 T-Zellen

Um die Aufnahmefähigkeit der hergestellten Fusionsproteine zu testen, wurde ein Aliquot davon auf 293 T Zellen gegeben und nach 2 Stunden wurde mittels Durchflusszytometrie die Veränderung der Granularität der Zellen nach Inkubation der Zellen mit fluoreszenzmarkiertem Antikörper beobachtet. Die Aufnahme rate wurde durch den Vergleich zwischen intrazellulärer und extrazellulärer Bestimmung bestimmt. Diese erfolgte spontan in bereits 6,8 % der Zellen, jedoch erreichte man durch terminale Fusion mit PTD eine signifikante Erhöhung auf 15,9 (N-Terminal) oder auf 11,5 % (C-terminal). Die Chimäre mit interner PTD-Domäne konnte hingegen keine signifikante Aufnahme bewirken. Somit ist gezeigt, dass p24 durch die Fusion mit PTD besser von den Zellen aufgenommen werden kann. Daher kann festgestellt werden, dass p24 (*E. coli*)-N-PTD sowohl die höchste Expressionsrate als auch die höchste Transduktionsrate erbringt. Aus diesem Grunde ist diese Chimäre das optimale Objekt, um diagnostische Routinen in Bezug auf die Testung von Impfstoffen gegen AIDS zu entwickeln. Bei der Applikation von p24/ GFP Fusionsproteinen auf die getesteten Zellen konnte hingegen keine Auswirkung der PTD festgestellt werden. Eine theoretische Erklärung wäre, dass das Ergebnis der Durchflusszytometrie mit den Konstrukten ohne GFP durch Fixierungsartefakte verfälscht worden ist und keine Aufnahme stattgefunden hatte. Dieses Problem kann jedoch auch durch die Größe des Proteins und damit verbundener Transduktionsprobleme hervorgerufen werden. Um diesbezüglich Klarheit zu

schaffen, müssten Aufnahmeversuche von p24 Protein, gekoppelt an einen kleineren Fusionsmarker, durchgeführt werden.

## 5 Peptidexpression im zellfreien System

### 5.1 Einleitung

Die Präparation von Peptiden wird in der Regel durch Anwendung der Merrifield Festphasensynthese (Merrifield 1965) unter Verwendung geschützter Aminosäuren durchgeführt. Da jeder Zyklus dieser sequenziellen Synthesemethode nur eine begrenzte Ausbeute haben kann, ist die Herstellung von längeren Peptiden aufwendig. Besonders für Peptide, die mit stabilen Isotopen, vor allem mit  $^{13}\text{C}$ , markiert sind, ist die chemische Festphasensynthese ab einer gewissen Länge nicht mehr sinnvoll. Eine sinnvolle Methode für die Synthese längerer Peptide ist die Herstellung von Fusionsproteinen zur heterologen Expression. Dazu wird die codierende Sequenz für das gewünschte Peptid an ein größeres Protein angefügt, welches in hohem Maße im gewählten System (meist *E. coli*) exprimiert. Dazu werden oftmals die Glutathion-S-Transferase (GST) oder auch das maltosebindende Protein (MBP) verwendet (z.B.: Smith *et al.*, 1988, Bassford *et al.*, 1979). Vorteil dieser Methode ist es, dass die Ausbeute an Peptid nicht mehr in dem Maße längenabhängig ist wie bei der chemischen Synthese. Jedoch werden die hohen Kosten für die Synthese von markierten Peptiden durch die hohen Kosten der Kulturmedien zum Teil wieder erreicht. Desweiteren ist nicht kalkulierbar, wie stark die Expression des Trägerproteins durch die Peptidfusion beeinträchtigt wird und wie effizient die Abspaltung des Peptids vonstatten geht. Der Grund, weshalb Fusionspartner angefügt werden müssen, liegt darin, dass die kurzen Peptide im Wirtsorganismus als proteolytische Fragmente größerer Proteine erkannt werden und deshalb weiter degradiert werden.

Aufgrund dieser bei beiden etablierten Systemen vorhandenen Unzulänglichkeiten war es interessant, die Möglichkeiten der Peptidexpression im zellfreien System zu analysieren. Denn bei der *in-vitro* Transkription/Translation wird zum einen nur das Zielprotein und nicht der ganze Organismus mit stabilen Isotopen markiert. Zum anderen kann davon ausgegangen werden, dass die Länge des Peptids kaum einen mit der chemischen Synthese vergleichbaren Einfluss auf die Ausbeute der Reaktion hat.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde deshalb versucht, die amyloid- $\beta$  Peptide ( $\text{A}\beta$ ), die an der Ausprägung der Alzheimerschen Erkrankung beteiligt sind, über die zellfreie Expression zu präparieren.

## Die Alzheimersche Erkrankung

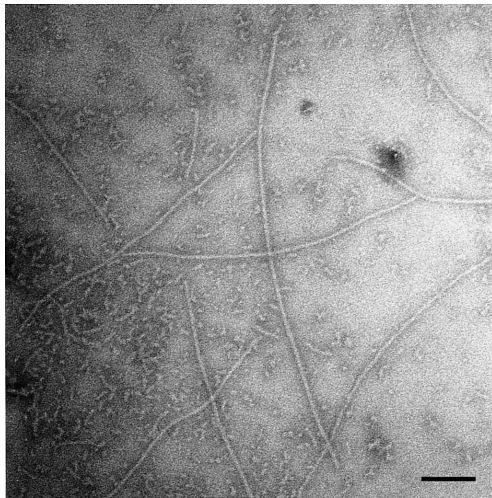


Abbildung 5.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von amyloiden Fibrillen in Wasser, ausgehend von A $\beta$  1-42; Durchmesser der Fibrillen ca. 70-80 Angström; Balken entspricht 1000 Angström (aus Serpell 2000)

1907 das erste Mal vom bayerischen Psychiater Alois Alzheimer beschrieben (Alzheimer 1907), stellt die nach ihm benannte Krankheit die häufigste Ursache für altersbedingte Demenz dar. Das Krankheitsbild kann charakterisiert werden durch einen fortschreitenden Gedächtnisverlust, gestörte Wahrnehmungen, Verhaltensänderungen mit Paranoia und zunehmendem Sprachverlust (zusammengefasst in Selkoe, 2001). In den 1960er Jahren konnten durch Elektronenmikroskopie (Abbildung 5.1) (Shirahama *et al.*, 1967) die ultrastrukturellen Veränderungen im Nervensystem analysiert werden und senile Plaques und neurofibrilläre Bündel identifiziert werden. Inzwischen kann die

neurochemische Zusammensetzung der amyloiden Plaques genauer charakterisiert werden (Jarrett *et al.*, 1993). Sie stellen ein extrazelluläres Aggregat an A $\beta$ -Peptid dar, das zum Großteil aus der Spezies mit 42 Aminosäuren besteht, wobei jedoch auch ein großer Anteil an A $\beta$ -Peptid mit 40 Aminosäuren vorhanden ist. Die Superorganisation der Peptide ausgehend

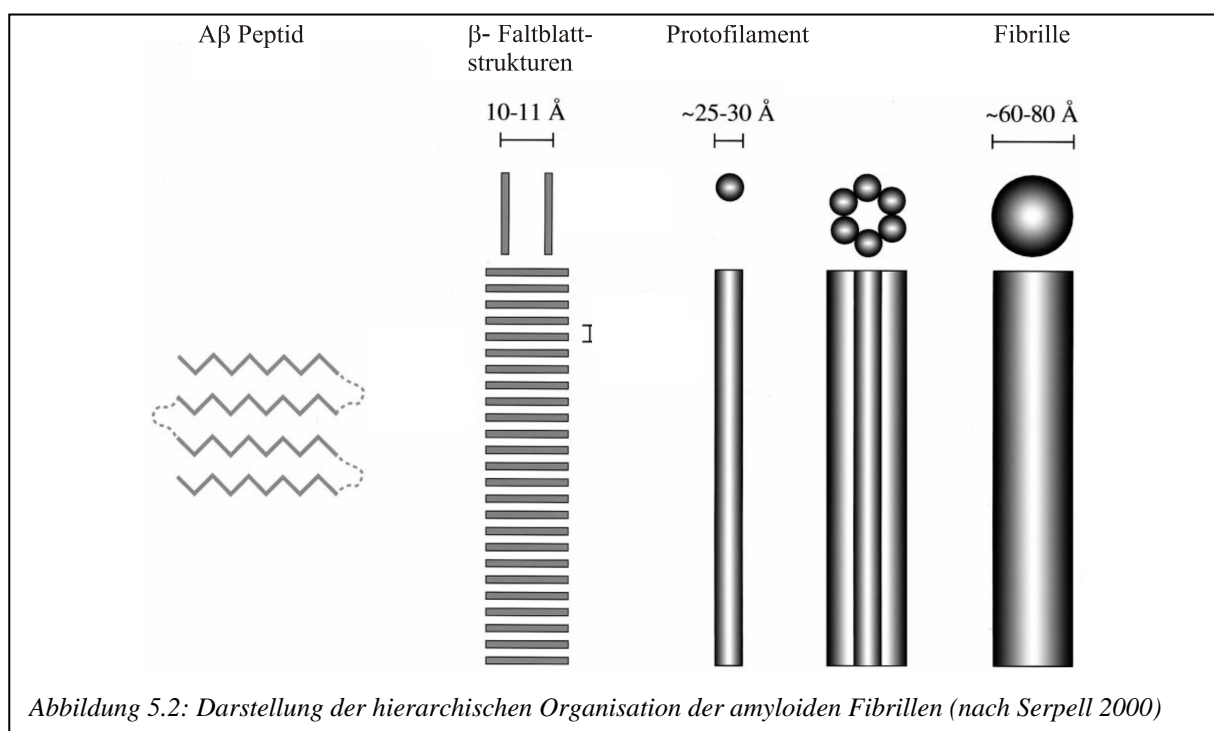


Abbildung 5.2: Darstellung der hierarchischen Organisation der amyloiden Fibrillen (nach Serpell 2000)



von den Monomeren bis hin zur elektronenmikroskopischen Fibrille ist in Abbildung 5.2 dargestellt. Die hier dargestellte Aggregation erfolgt spontan, ihre Geschwindigkeit ist abhängig von der vorliegenden Spezies an A $\beta$ -Peptid (Riek *et al.*, 2001). Das Aggregat selbst besteht aus einer fibrillären Anordnung der Monomeren, die ein antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt bilden (Abbildung 5.3a).

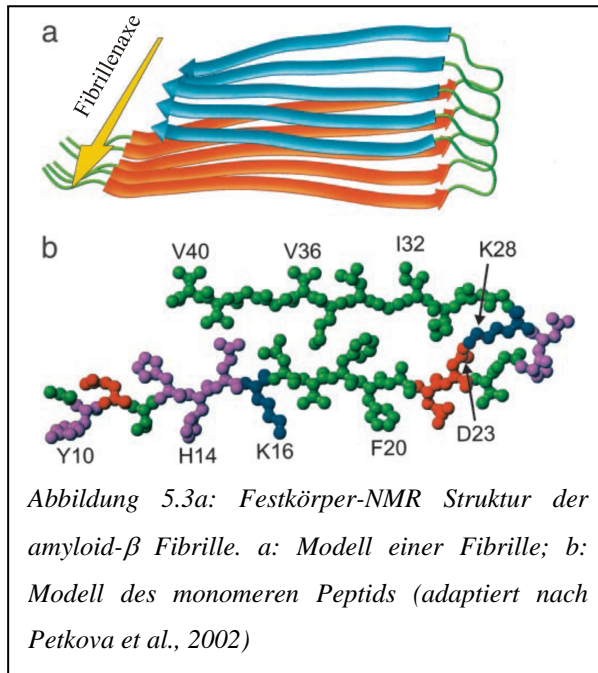


Abbildung 5.3a: Festkörper-NMR Struktur der amyloid- $\beta$  Fibrille. a: Modell einer Fibrille; b: Modell des monomeren Peptids (adaptiert nach Petkova *et al.*, 2002)

Diese fibrilläre Struktur entsteht aus der löslichen Version der A $\beta$ -Peptide. In Lösung liegen sie (vor allem das A $\beta_{40}$ ) in  $\alpha$ -helikaler Form vor (Crescenzi *et al.*, 2002; Janek *et al.*, 2001; Watson *et al.*, 1998, siehe Abbildung 5.3b).

Die A $\beta$ -Peptide entstehen durch Proteolyse des APP (Amyloid Precursor Protein). Dabei handelt es sich um ein Transmembranprotein, dessen Funktion noch nicht geklärt ist (Hartmann 2001) und welches durch die Aktivität von Sekretasen ( $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretasen) gespalten wird (Ling *et al.*, 2003; Abbildung 5.4). Der Transmembrananteil in Kombination mit einem extrazellulären Teil des APP bildet dabei nach erfolgter Teilung mit  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase das A $\beta$ -Peptid. Der C-terminale Schnitt ist nicht genau definiert, es existieren verschiedene Spaltstellen. Die wichtigsten Fragmente sind das A $\beta_{40}$  und A $\beta_{42}$ . Im

nichtamyloidogenischen Pfad der APP Prozessierung spaltet die  $\alpha$ -Sekretase ein unproblematisches Fragment von 83 Aminosäuren Länge ab (C83) (Ling *et al.*, 2003). Im amyloidogenischen Pfad hingegen spalten zuerst die  $\beta$ -Sekretasen BACE 1 und BACE 2 (Dingwall *et al.*, 2001, Huse *et al.*, 2000), wodurch C99, das C-terminale Fragment mit 99 Aminosäuren Länge entsteht. Diese beiden Fragmente (C83 und C99) können durch die sogenannten  $\gamma$ -Sekretasen proteolysiert werden. Aus dem C83 entsteht dabei das unproblematische P3, aus dem C99 hingegen die A $\beta$ -Peptide (Jarret *et al.*, 1993). Die Definition der  $\gamma$ -Sekretasen ist noch nicht vollständig

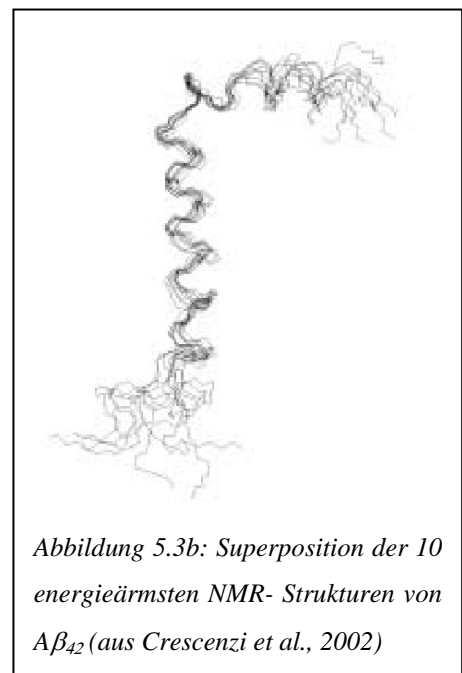
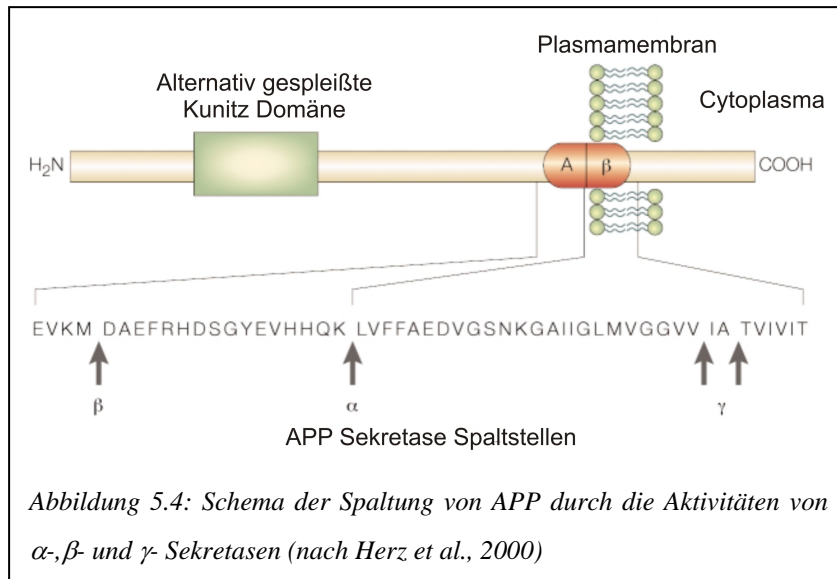


Abbildung 5.3b: Superposition der 10 energieärmsten NMR-Strukturen von A $\beta_{42}$  (aus Crescenzi *et al.*, 2002)



abgeschlossen, jedoch sind die Preseniline PS1 und PS2 höchstwahrscheinlich für diese Aktivität verantwortlich (Kimberly *et al.*, 2000). Mutationen in diesen Proteinen kommen gehäuft bei der familiär auftretenden Form der Alzheimerschen

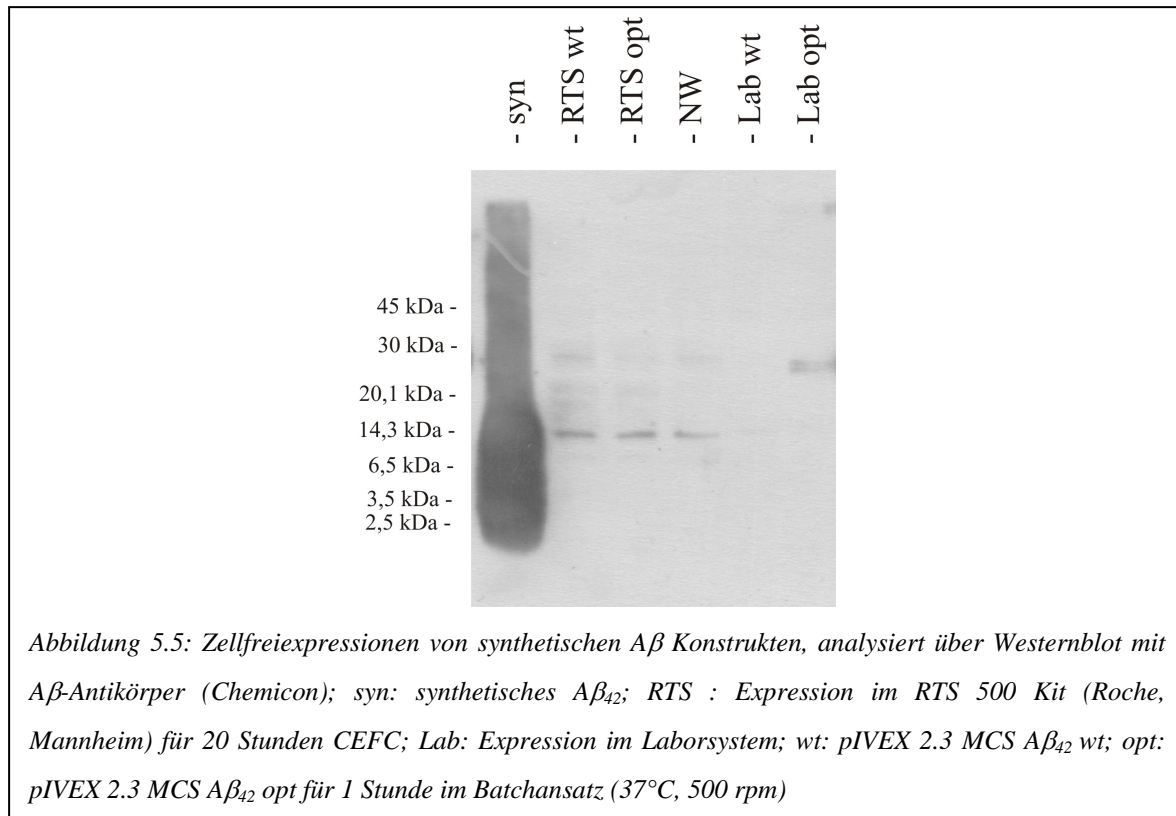
Erkrankung vor und bewirken eine Erhöhung der Konzentration an Aβ<sub>42</sub> (Scheuner *et al.*, 1996, Citron *et al.*, 1997). Die Sekretasen sind ebenfalls membranständig lokalisiert. Es gibt Hinweise darauf, dass Cholesterin eine Rolle bei der Entscheidung spielt, ob eine α- oder β-Sekretase APP spalten kann. Ein Hinweis darauf ist, dass das Allel ε4 des apoE-Gens ein Risikofaktor für die Alzheimersche Erkrankung darstellt (Hartmann 2001). Dieses Apolipoprotein ist ein Cholesterintransporter innerhalb des zentralen Nervensystems. Es wurde postuliert, dass vor allem Membran Mikrodomänen, sogenannte „lipid rafts“, eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Aβ-Peptiden haben. So ist es möglich, dass β-Sekretasen nur in Rafts arbeiten, α-Sekretasen hingegen nur außerhalb. Eine Cholesterinreduktion würde damit bewirken, dass die Wahrscheinlichkeit reduziert ist, dass sich sowohl APP als auch eine β-Sekretase im selben Raft befinden (Simons und Ehehalt 2002). Neben der Beteiligung an der Entstehung der Aβ-Peptide haben Lipide, vor allem Cholesterin oder Ganglioside wie GM1, auch einen entscheidenden Einfluss auf die Faltung der Aβ-Peptide, indem sie die Ausbildung von Fibrillen begünstigen (Kakio *et al.*, 2002 Golde *et al.*, 2001). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Membranvesikel mit GM1 bei einem pH von 7 die α-helikale Form von Aβ begünstigen und bei einem pH von 6 β-Faltblattstrukturen ausgebildet werden (McLaurin *et al.*, 1998). Dieser lipidabhängige Umfaltungsprozess ist der Schlüssel zum Verständnis der molekularen Ursachen der Alzheimerschen Erkrankung. Der Faltungsverlauf soll mit Hilfe der Hochdruck-NMR (Kremer 2006) analysiert werden, wozu große Mengen an Aβ-Peptiden benötigt werden. Um diesen Bedarf zu decken, wäre es, wie oben beschrieben, von Vorteil, diese Peptide zellfrei markiert mit stabilen Isotopen herstellen zu können.

## 5.2 Ergebnisse

Für die beschriebenen Titrationsversuche mit Lipidmischungen müssen größere Mengen an mit stabilen Isotopen markiertem A $\beta$ -Peptid hergestellt werden. Da eine chemische Synthese wegen der immensen Kosten nicht praktikabel ist, wurde versucht, das Peptid isotopenmarkiert durch zellfreie Transkription/Translation herzustellen. Gegenüber der Markierung in *E. coli* im Rahmen heterologer Expression besteht der Vorteil, dass der Einbau von Isotopen in das Zielprotein effektiver ist, da nicht der ganze Organismus, sondern nur das gewünschte Protein markiert wird. Wegen dieser prinzipiellen Attraktivität der zellfreien Expression wurden im Folgenden die Möglichkeiten der Herstellung von Peptiden am Beispiel der A $\beta$ -Peptide untersucht.

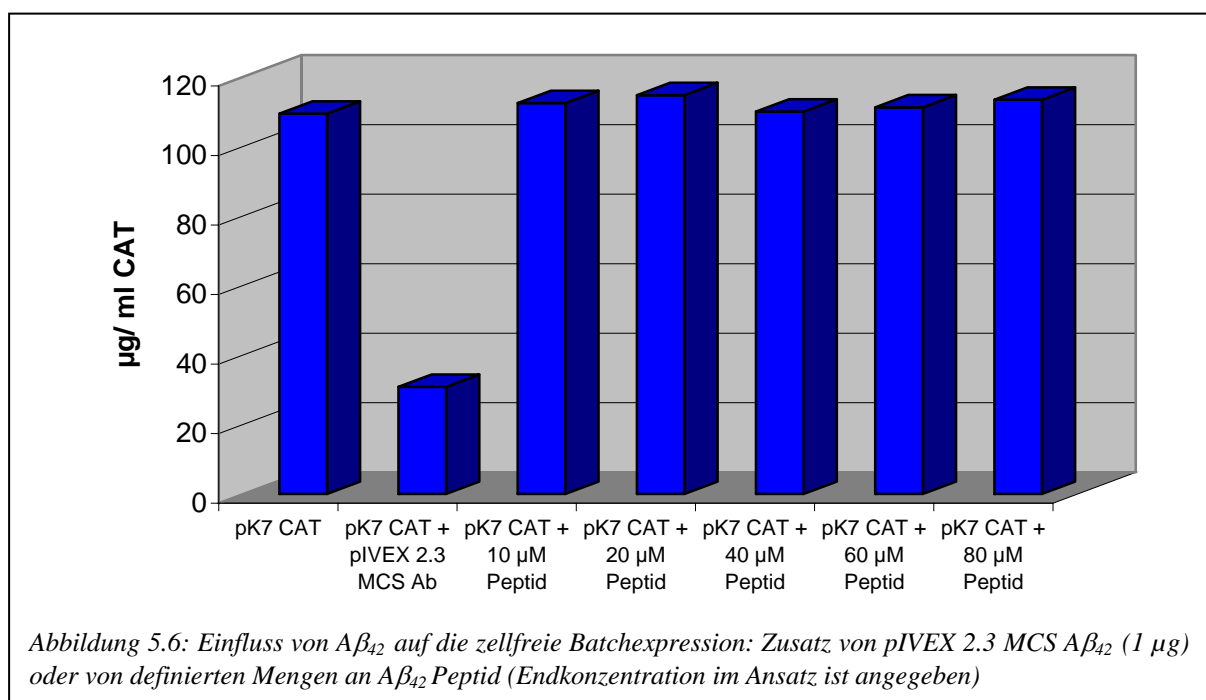
### 5.2.1 Direkte Expression der Peptide, markiert mit C-terminalem His<sub>6</sub>-Tag

Als erstes wurde versucht, A $\beta$ -Peptide auf direktem Wege zu exprimieren. Eine solche Expression wäre in lebenden Zellen nicht möglich, da von diesen so kurze Aminosäureketten als Fragmente zellulärer Proteine eingestuft und wieder abgebaut werden würden. Da im zellfreien Expressionssystem zelluläre Regulationsmechanismen reduziert sind und gleichzeitig proteolytische Degradation durch den Einsatz von Proteaseinhibitoren begrenzt werden kann, ist es plausibel, dass Peptide dieser Länge zellfrei hergestellt werden können. Um diese Möglichkeit zu überprüfen wurden zwei verschiedene Konstrukte ausgehend von der Aminosäuresequenz vom A $\beta$ -Peptid mit 42 Aminosäuren Länge (A $\beta$ <sub>42</sub>) verwendet. Diese Plasmide wurden von GENEART hergestellt. In den Vektor pIVEX 2.3 MCS wurde dazu entweder die im Menschen vorkommende Nukleotidsequenz oder eine auf Expression in *E. coli* hin optimierte Sequenz insertiert (Sequenzen im Anhang). Als Restriktionsschnittstellen wurden *Nde I* und *Sma I* verwendet. Es entstanden Konstrukte des A $\beta$ <sub>42</sub>, die sowohl N-terminal um ein Methionin und C-terminal um einen His<sub>6</sub>-Tag erweitert waren. Die Expression erfolgte entweder im Batchansatz (siehe 7.2.1.3) oder mit dem Fertigkit RTS 500 (Roche, Mannheim). Der Ansatz im RTS 500 wurde von Dr. Michael Spring (GENEART, Regensburg) durchgeführt. Die Analytik der Expressionsansätze erfolgte durch Westernblot mit einem Antikörper gegen das Epitop der Aminosäuren 17-22 des A $\beta$ <sub>42</sub> (Chemicon). Es konnte damit sowohl in der Batchreaktion mit einer Stunde Dauer als auch mit dem RTS 500 System nach 20 Stunden keine Expression nachgewiesen werden (Abbildung 5.5).



Bei keiner der Banden ist weder auf der Höhe der Konstrukte (4514 Dalton) noch bei der Positivkontrolle über die ganze Bande verteilt eine Färbung durch die Antikörperreaktion erkennbar.

Um ausschließen zu können, dass die Expressionsreaktion durch Fehler im System nicht stattgefunden hat, wurde eine Coexpression der Plasmide pK7CAT und von pIVEX 2.3 MCS



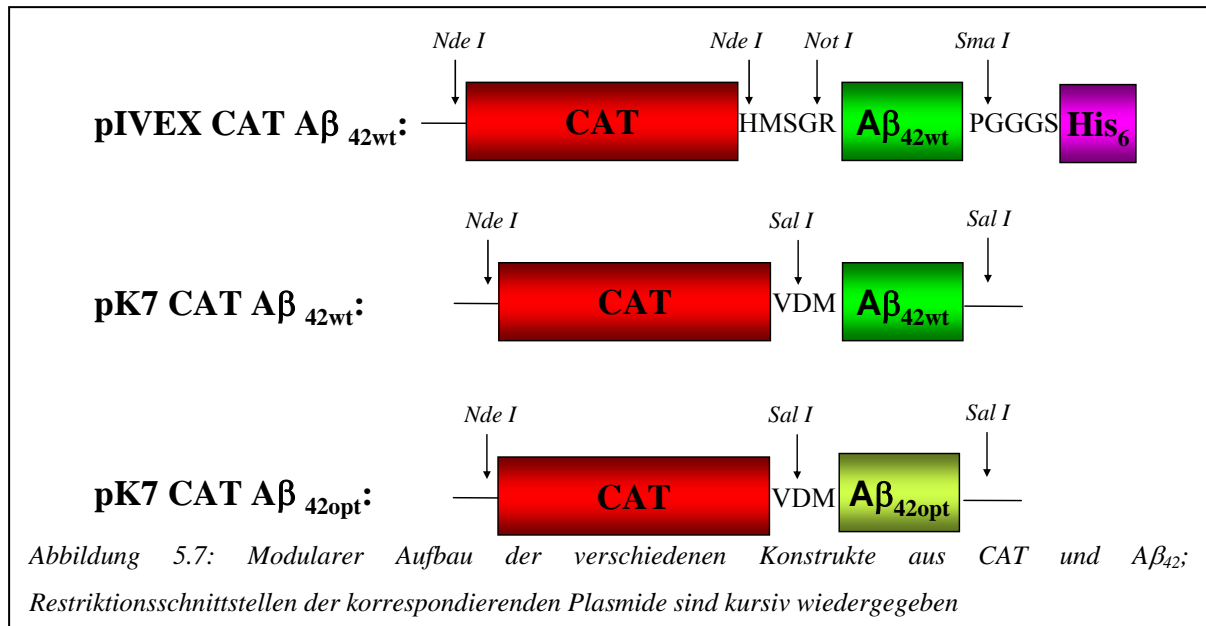
A $\beta$ <sub>42</sub> <sub>opt</sub> (auf *E. coli* optimierte Nukleotidsequenz) durchgeführt. Weiterhin wurden, um eine Toxizität des Zielpeptids auf den Translationsapparat ausschließen zu können, zur Expression des Reportergens CAT definierte Mengen des A $\beta$ <sub>42</sub> zugegeben. Das Ergebnis der beiden Versuche ist in Abbildung 5.6 dargestellt. Es wurde festgestellt, dass sowohl bei Zugabe des Plasmids pIVEX 2.3 MCS A $\beta$ <sub>42</sub> <sub>opt</sub> als auch bei Zugabe des Peptids selbst eine Expression des Reportergens beobachtbar war, wobei jedoch bei der Coexpression die Menge an exprimierter CAT signifikant reduziert war. Somit kann eine prinzipielle Expressionsfähigkeit des Systems sowohl in Anwesenheit des Plasmids als auch in Anwesenheit des Zielpeptids bestätigt werden.

Da gezeigt werden konnte, dass bei Anwesenheit des Zielpeptids eine Expression im zellfreien System prinzipiell möglich ist, muss eine Alternative gefunden werden, um die auf direktem Wege nicht mögliche Expression der A $\beta$ -Peptide zu erreichen.

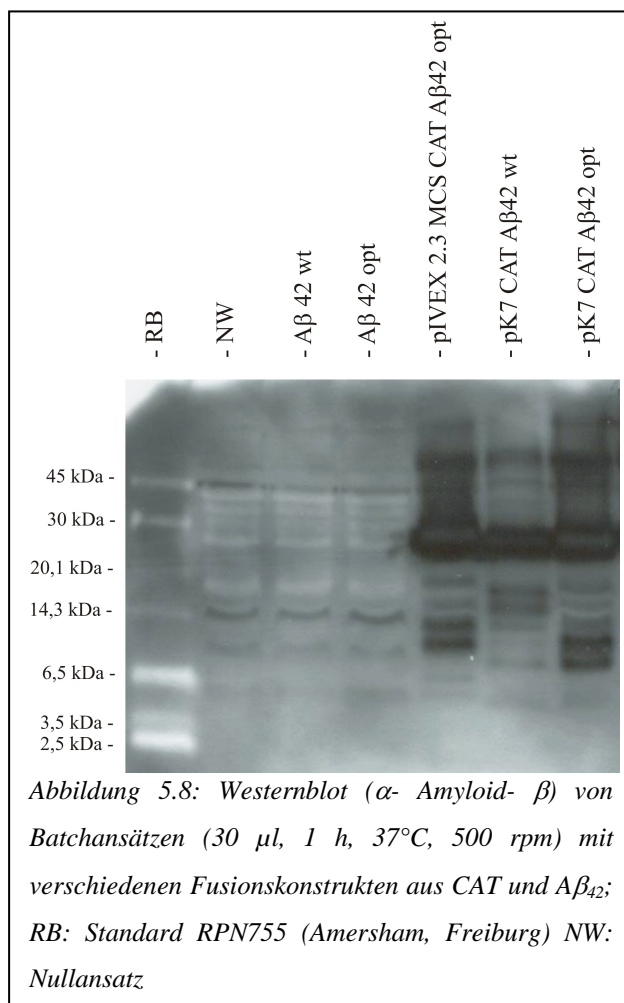
### 5.2.2 N-Terminale Fusion von amyloid- $\beta$ Peptiden an Proteine als Expressionshelfer

Um sicherzustellen, dass eine Expression grundsätzlich möglich ist, wurden A $\beta$ -Peptide an ein Protein C-terminal angefügt. Diese Methode ist bereits bei der Expression von Peptiden und problematischen Proteinen aus der heterologen Expression in *E. coli* bekannt. Dabei wird davon ausgegangen, dass ein großes Protein die Löslichkeit des Zielpeptids erhöht. Zusätzlich werden die verwendeten Proteine sehr effektiv in den Zellen exprimiert, sodass die finale Ausbeute an Zielpeptid nach der Abspaltung des Fusionspartners sehr hoch ist. Ein für diesen Zweck sehr häufig verwendetes Protein ist die Glutathion-S-Transferase (GST). In dieser Studie wurde jedoch CAT verwendet, um Fusionskassetten mit den A $\beta$ -Peptiden herzustellen. CAT wurde aufgrund der exzellenten Expressionsfähigkeit im zellfreien System als Fusionspartner gewählt. Als Vektoren fanden pET14b für Fusionsproteine mit N-terminalem His<sub>6</sub>-Tag, pIVEX 2.3 MCS für einen C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag und pK7 für Fusionsproteine ohne His<sub>6</sub>-Tag Verwendung (siehe Abbildung 5.7). Anfangs wurde nur die prinzipielle Expressionsfähigkeit der Fusionsproteine untersucht, weshalb bei den ersten Konstrukten auf eine Proteaseschnittstelle vor der Sequenz der A $\beta$ -Peptide verzichtet wurde.

Diese Konstrukte wurden in Batchansätze der zellfreien Transkription/Translation (7.2.1.3) eingesetzt, diese Ansätze nach Acetonfällung (7.2.3.3) und SDS-PAGE in einem Westernblot analysiert (Abbildung 5.8).



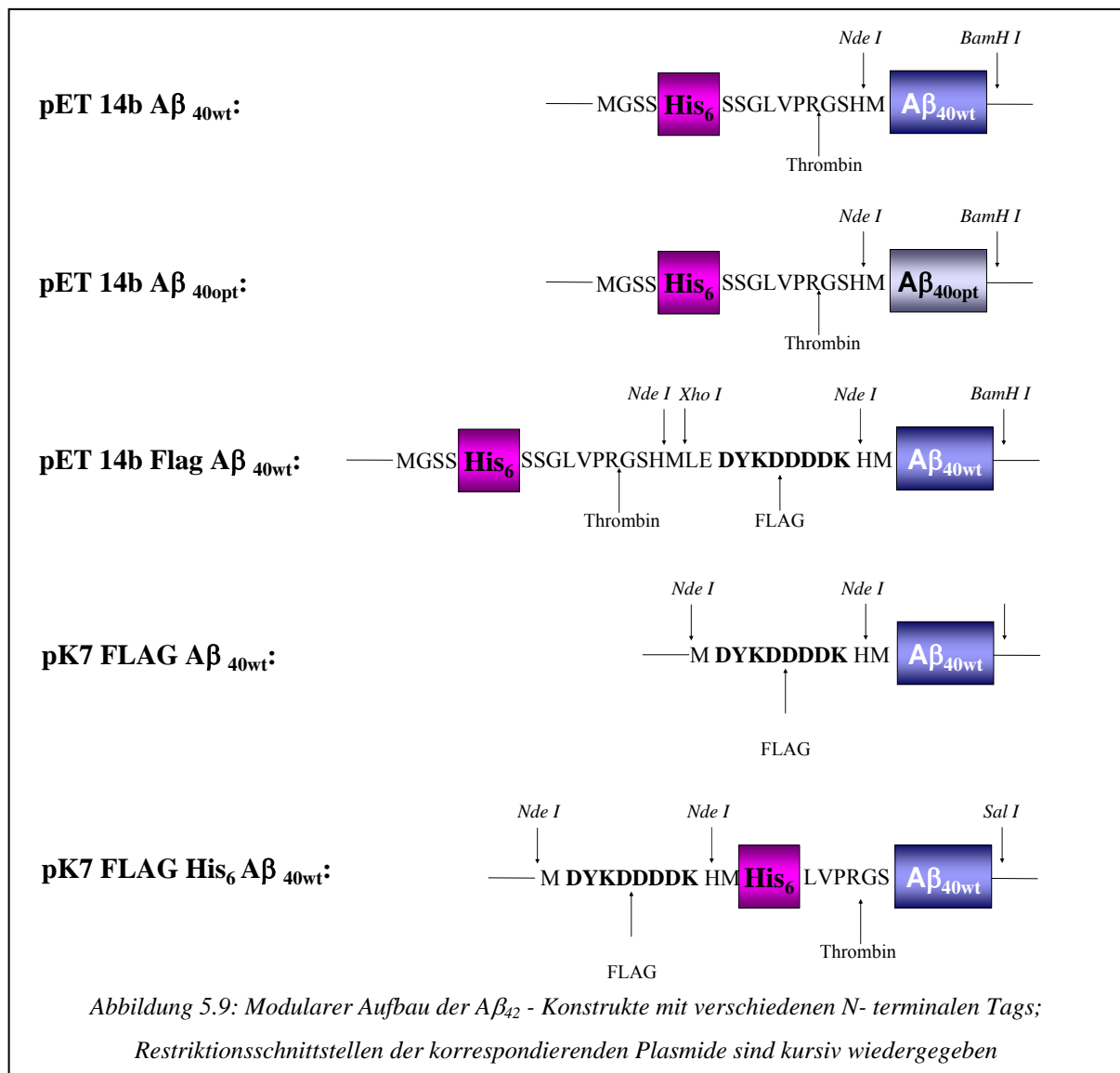
Es ist zu erkennen, dass Fusionsproteine aus CAT (N-terminal) und Aβ<sub>42</sub> im Gegensatz zu den reinen Aβ<sub>42</sub> Konstrukten schon nach einer Stunde Reaktionsdauer in einer deutlichen Expression resultieren. Damit ist sichergestellt, dass die Aβ-Peptide im zellfreien System



exprimieren können, wenn auch nur mit einer N-terminalen Extension. Das Problem dieses oder auch anderer großer Proteine als Fusionspartner für das herzustellende Peptid besteht darin, dass als Endprodukt der Expressionsreaktion die interessierende Aminosäuresequenz aufgrund der Größenverhältnisse nur in untergeordnetem Umfang hergestellt wird. Insbesondere bei einer geplanten Markierung des Peptids mit stabilen Isotopen muss davon ausgegangen werden, dass der größte Teil der Isotopen in uninteressante Fusionspartner eingebaut wird. Dadurch wird die Effizienz der Reaktion stark minimiert, weshalb anzustreben wäre, den Expressionstag zu verkleinern.

### 5.2.3 N-Terminale Fusion von amyloid- $\beta$ Peptiden mit kurzen Expressionstags

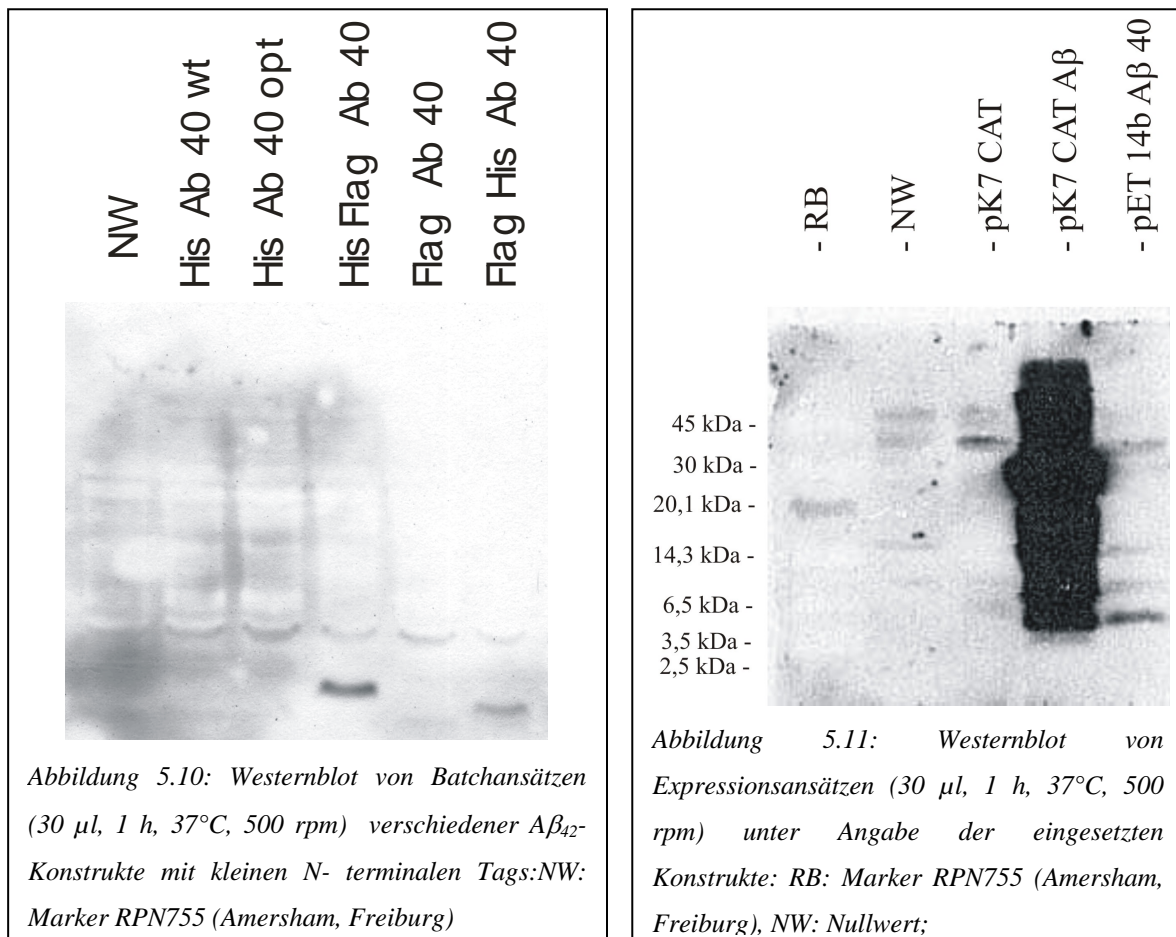
Kürzere Expressionstags haben den Vorteil, dass bei ausreichend hoher Expression neben dem Zielpeptid nur ein kurzes Fragment mit markiert wird. Aus diesem Grunde wurden His<sub>6</sub> Tag, FLAG-Tag und Kombinationen aus beiden N-terminal an die Sequenzen von A $\beta$ <sub>40</sub> angefügt. Dabei entstanden die in Abbildung 5.9 dargestellten Fusionskonstrukte. Hierbei wurde wiederum vorerst darauf verzichtet, die Fusionspartner durch Proteaseschnittstellen restlos abspaltbar zu machen.



Präparationen dieser Plasmide wurden in Batchansätze der zellfreien Expression eingesetzt und unter Verwendung eines gegen das A $\beta$  Peptid gerichteten Antikörpers (Abbildung 5.10) nach SDS-PAGE in einem Westernblot analysiert.



Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine Expression mit Verwendung kurzer Tags qualitativ nachgewiesen wurde. Von den Konstrukten mit längerem Tag entstand verhältnismäßig mehr Protein als von den kürzeren. Diese Expression wird jedoch nur bei verhältnismäßig langer Belichtungszeit des Westernblot sichtbar, was im direkten Vergleich der Konstrukte pK7 CAT A $\beta$ <sub>42</sub> und pET14b A $\beta$ <sub>40</sub> deutlich wird (Abbildung 5.11).

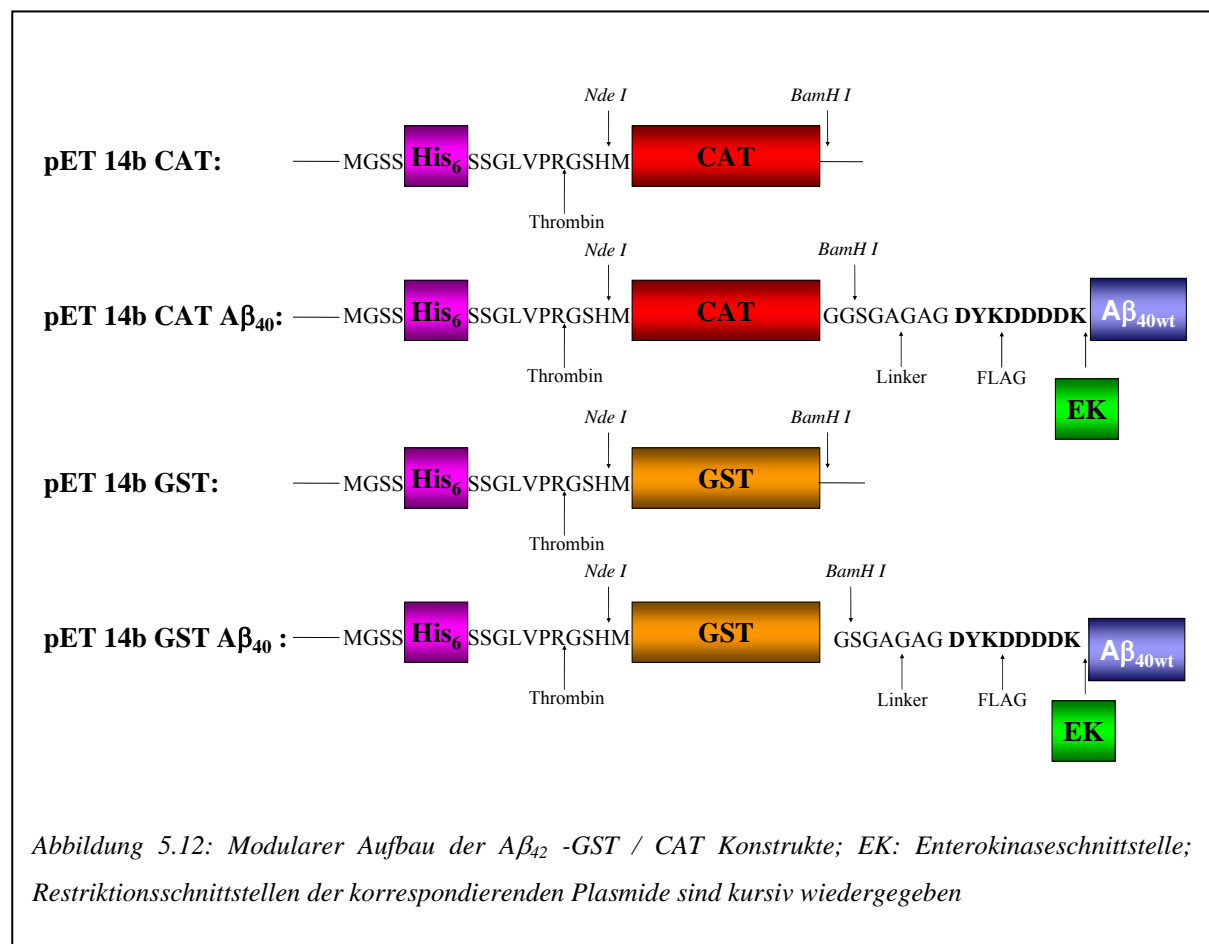


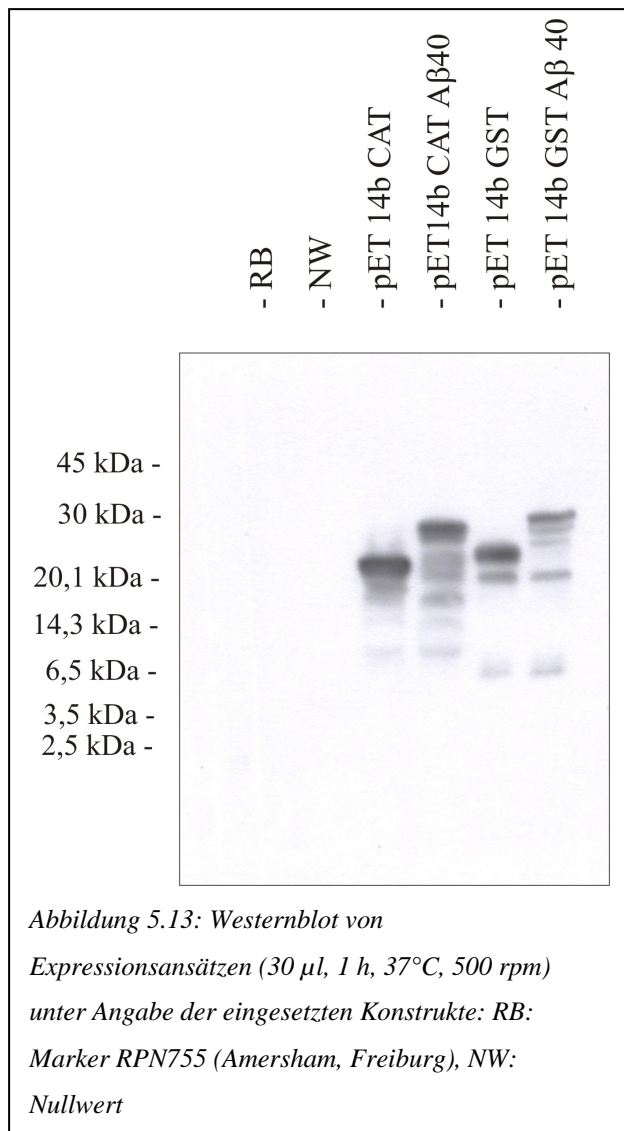
Wie daraus klar hervorgeht, muss äußerst lange belichtet werden, um das A $\beta$ <sub>40</sub> mit His<sub>6</sub>-Tag sichtbar zu machen, sodass das Fusionsprotein CAT A $\beta$ <sub>42</sub> in dieser Zeit extrem überbelichtet wird und als einziger Schmier auf dem Westernblot erscheint. Es wird darum davon ausgegangen, dass die Expression von A $\beta$ -Peptiden mit längeren Proteinen als Fusionspartnern trotz des höheren Aufreinigungsverlusts wesentlich sinnvoller ist. Daraus folgt, dass die weiteren Versuche mit Fusionsproteinen aus vollwertigen Proteinen und dem Zilopeptid durchgeführt werden.



### 5.2.4 Abspaltung des amyloid- $\beta$ Peptids durch Enterokinase

Wie unter 5.2.2 und 5.2.3 gezeigt wurde, ist es notwendig, mit Fusionskonstrukten von A $\beta$ -Peptiden weiterzuarbeiten, die N terminal vom Zielpeptid ein relativ großes Protein zur Expressionssteigerung tragen. Anfangs wurde wegen der Fokussierung des Projekts auf eine Expression im System der *in-vitro* Transkription/Translation auf die Chloramphenicol-Acetyltransferase zurückgegriffen. CAT war wegen der sehr hohen Expressionsrate im zellfreien System von großem Interesse. Es wurden zuerst Konstrukte ohne Proteaseschnittstelle und ohne N-terminalen Aufreinigungstag verwendet. Darüberhinausgehend wurde nun neben der Fusion mit CAT auch ein Fusionsprotein mit GST erstellt und ein His<sub>6</sub>-Tag und eine Enterokinaseschnittstelle inseriert. Dazu wurden die Sequenzen von CAT oder GST in pET14b kloniert und über einen Linker mit Enterokinaseschnittstelle an die Sequenz des A $\beta$ <sub>40wt</sub> geknüpft (Schema siehe Abbildung 5.12). Neben diesen Fusionskonstrukten wurden auch Plasmide generiert, in denen allein die Fusionspartner vorhanden waren, und zwar um über einen Westernblot (Abbildung 5.13) abschätzen zu können, wie viel an Fusionsprotein im Vergleich zu CAT / GST hergestellt wird.



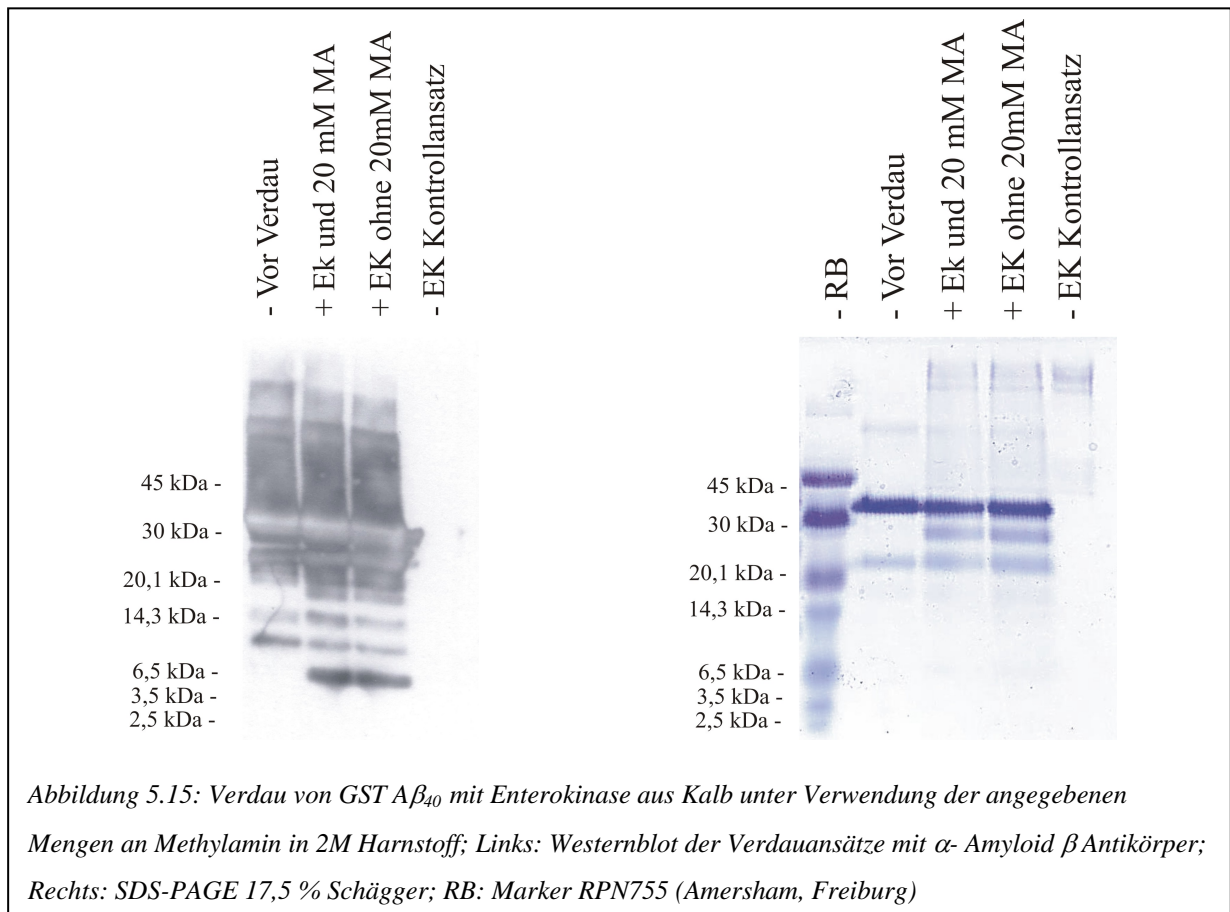
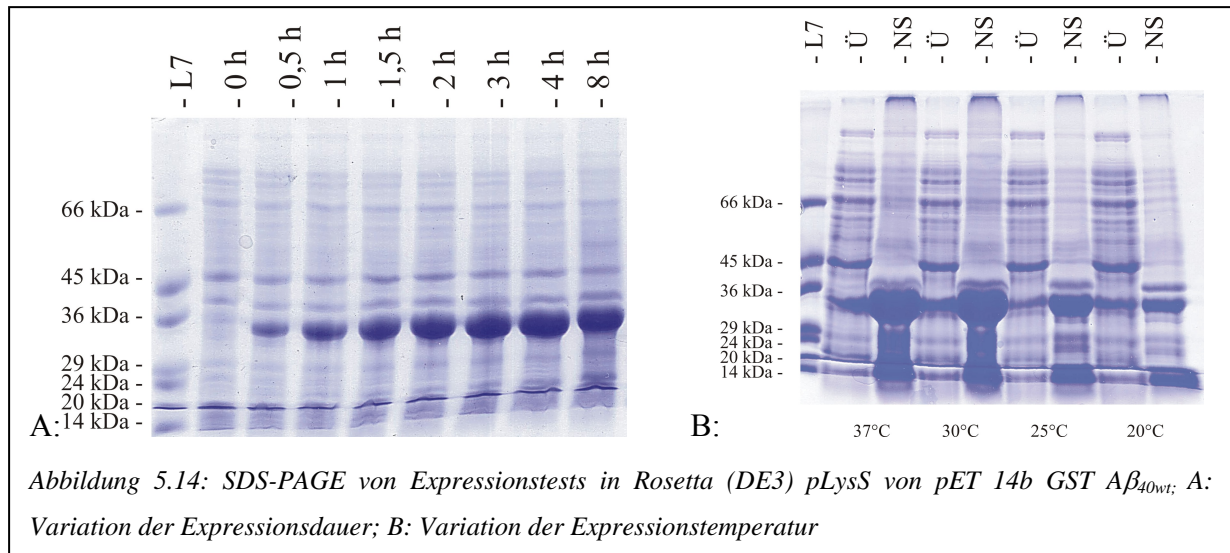


Als Antikörper wurde HisProbe (SantaCruz, USA) verwendet, um über die Antikörperreaktion eine Relativaussage der Expressionsrate zu erhalten. Dies ist deshalb interessant, da von pET14bCAT bekannt ist, dass im etablierten Zellfreisystem Expressionsraten von ca. 100 µg/ml in einer Stunde möglich sind. Auf dem Blot ist erkennbar, dass die Fusionskonstrukte beinahe identisch stark exprimieren wie CAT oder GST alleine. Außerdem ist erkennbar, dass GST deutlich geringer hergestellt wird als CAT.

Um den weiteren Weg hin zum gereinigten Peptid erarbeiten zu können, wurden die Fusionsproteine in *E. coli* überexprimiert. Dies war möglich, weil die Hauptmenge des exprimierten Fusionskonstrukts unlöslich vorlag und so von einem in Harnstoff vollständig entfalteten Fusionsprotein ausgegangen werden

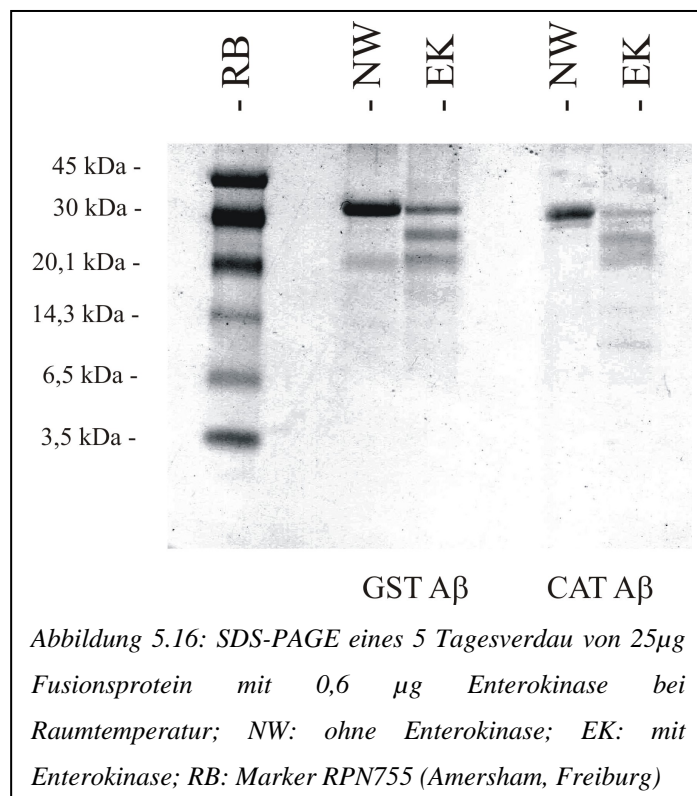
musste. Aus diesem Grunde war es legitim und weniger aufwendig, das Protein unmarkiert in Zellen herzustellen.

Die Expression der Proteine erfolgte in Rosetta (DE3) pLysS (Methode siehe 7.2.2.5). Die Konstrukte wurden für 4 Stunden exprimiert, der überwiegende Teil davon lag unlöslich in den Zellen vor (Abbildung 5.14). Nach erfolgter Rückfaltung auf eine Harnstoffendkonzentration von 2 molar wurden die Fusionsproteine CAT Aβ<sub>40</sub> und GST Aβ<sub>40</sub> mit Enterokinase verdaut. Dazu wurde zunächst Enterokinase aus Kälberdarm (Roche, Mannheim) verwendet. Der Verdau erfolgte nach Anleitung des Herstellers durch Zugabe von 0,6 µg Protease zu 25 µg Protein für 20 Stunden. Entsprechend dieser Anleitung wurde einem Verdauansatz auch Methylamin aufgrund der Verwendung eines harnstoffhaltigen Puffers zugesetzt. Der Ansatz wurde durch SDS-PAGE und durch Westernblot analysiert (Abbildung 5.15 zeigt exemplarisch den Verdau von GST Aβ<sub>40</sub>).



Auf dem Gel ist zu erkennen, dass unabhängig von der Verwendung von Methylamin ein um ca. 5 kDa leichteres Protein als das Fusionsprotein mit ca. 30 kDa entsteht. Daraus konnte geschlossen werden, dass der Verdau erfolgreich verlaufen war. Auf dem Westernblot war nach dem Verdau eine neu entstandene Bande bei ca. 6,5 kDa erkennbar. Dieses Peptid ist zwar eigentlich etwas schwerer als die berechnete Masse von A $\beta_{40}$  mit 4327 Dalton, aber in Ermangelung einer geeigneten Vergleichsprobe konnte nicht ausgeschlossen werden, dass es

sich um das Zielpeptid handelt. Um das neu entstandene Fragment besser analysieren zu können, musste davon eine größere Menge hergestellt werden. Dazu war sowohl das Gesamtvolumen des Verdaus als auch insbesondere die Effizienz des Verdaus zu erhöhen. Wie in Abbildung 5.15 erkennbar, war beim Verdaus unter Verwendung von aus Kälberdarm aufgereinigter Protease nur eine sehr geringe Effizienz von wenigen Prozent erreicht worden. Deshalb wurde versucht, durch die Verwendung von Detergentien, verschiedenen Harnstoffkonzentrationen und durch den Zusatz von NaCl zur Stabilisierung des Fusionsproteins, die Effizienz zu steigern. Die Verwendung von 0, 1, 2 oder 3 M Harnstoff, von 5% oder 10% Acetonitril, von 0,01%, 0,1% oder 1% Triton X-100 und die Verwendung von Tween 20 (0,01%, 0,1% oder 1%) ergab keine Verbesserung der Verdaueffizienz. Einzig die Verlängerung der Inkubationsdauer auf fünf Tage (Abbildung 5.16) erbrachte eine erhöhte

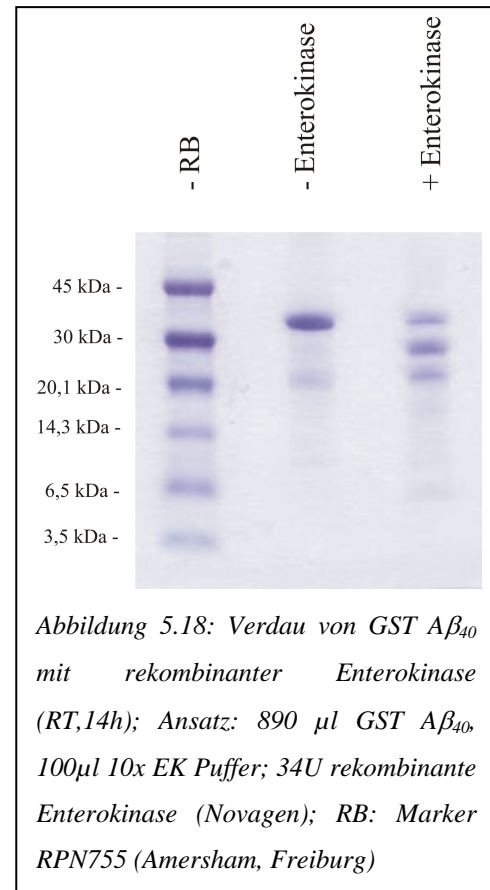
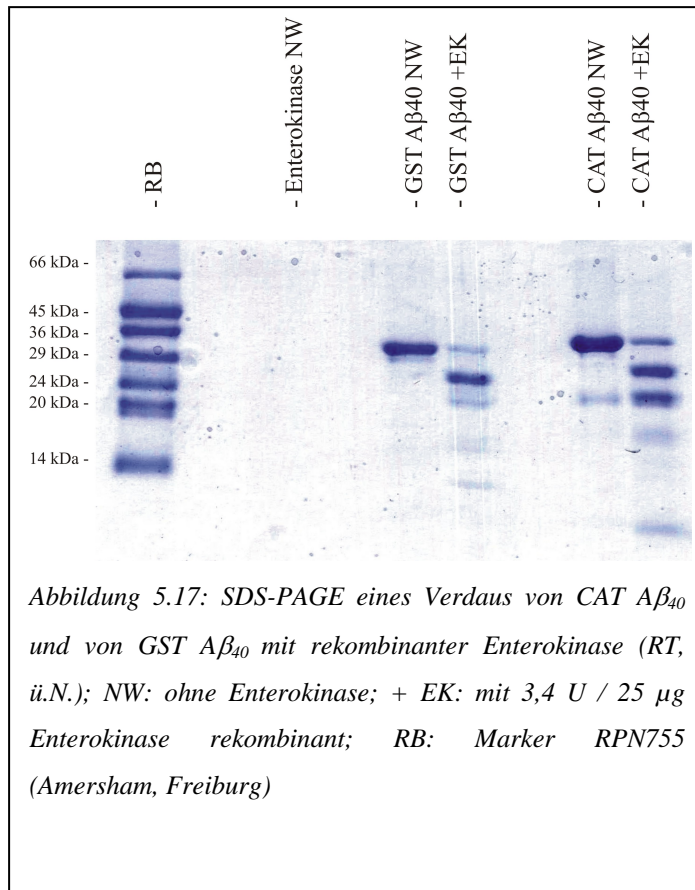


Spalteffizienz von geschätzten 40 bis 60 %.

Da jedoch sehr viel an Enterokinase eingesetzt werden musste, kam der Erwerb der für eine Präparation nötigen Menge nicht in Frage.

In der Literatur wird darauf hingewiesen (Collins-Racie *et al.*, 1995), dass die katalytisch aktive, leichte Kette der Enterokinase (EK<sub>L</sub>) allein aktiver bei der Spaltung von Fusionsproteinen sei als das gesamte natürliche Enzym. Aus diesem Grund wurde eine rekombinant hergestellte Enterokinase (Novagen) verwendet.

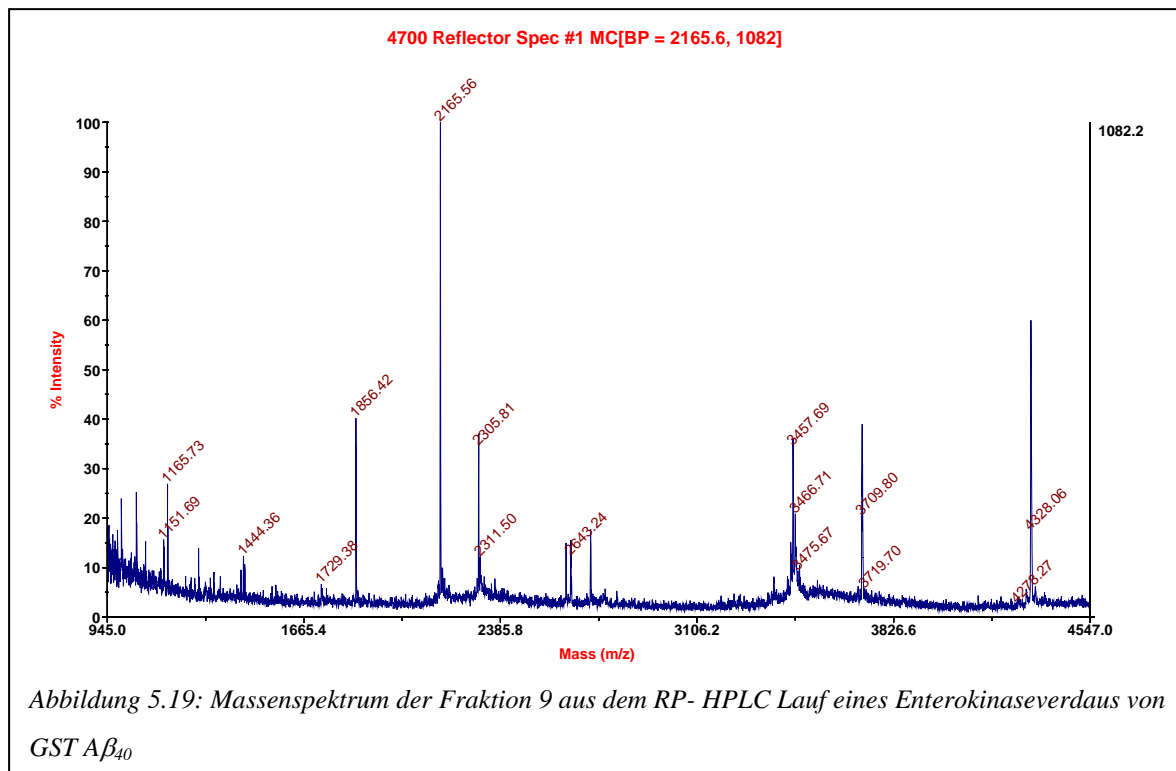
Wie in Abbildung 5.17 sichtbar, ist nach einer Verdauszeit von 12 Stunden bereits fast das gesamte Fusionsprotein verdaut, und zwar sowohl bei der Verwendung von CAT Aβ<sub>40</sub> als auch von GST Aβ<sub>40</sub>.



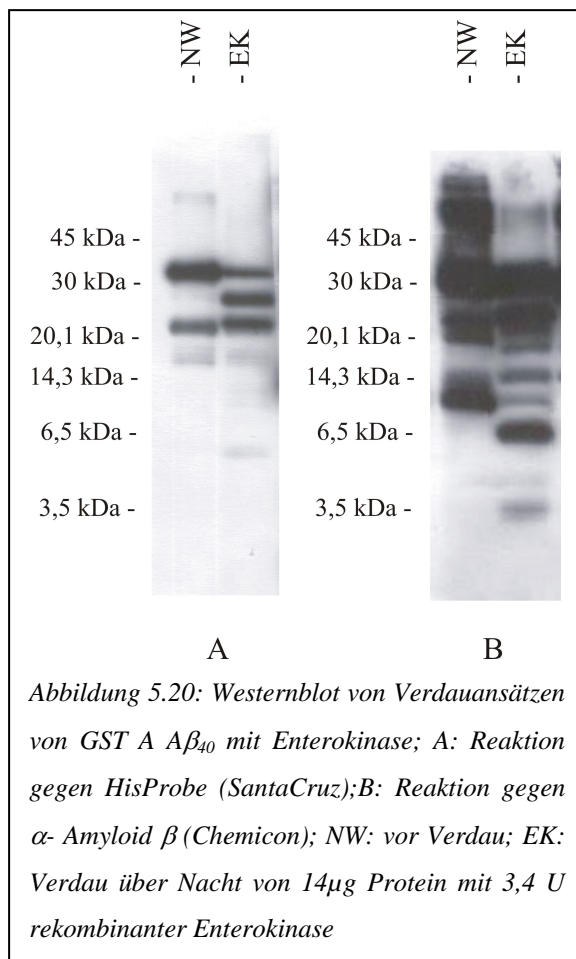
Ausgehend von dieser effektiven Spaltung wurde ein präparativer Verdaus von 1 ml Volumen durchgeführt. Dazu wurden 890  $\mu$ l einer Lösung von rückgefaltetem GST A $\beta_{40}$  mit 10  $\mu$ l Enterokinase (Merck, Darmstadt) und 100  $\mu$ l 10x Enterokinasepuffer versetzt und über 14 Stunden hinweg bei Raumtemperatur inkubiert. Ein Aliquot von 20  $\mu$ l wurde vor und nach der Inkubation abgenommen und auf einem SDS-Gel der Verdauungsprozess dokumentiert (Abbildung 5.18).

Der restliche Ansatz wurde auf eine Nucleosil C4 120 (MZ Analysentechnik (Mainz), äquiliert in 0,1% Trifluoressigsäure) aufgetragen und die Proteine mit einem Acetonitrilgradienten eluiert. Die Hälfte der Fraktionen der Größe 300  $\mu$ l wurden lyophilisiert und in 40  $\mu$ l SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die darin enthaltenen Proteine wurden auf einem SDS Gel coomassiegefärbt. In Fraktion 9 war eine isolierte Bande (ähnlich der in Abbildung 5.17 beschrieben) zu erkennen. Ein Teil der nicht lyophilisierten Hälfte wurde massenspektrometrisch analysiert (siehe Abbildung 5.19), der Rest der Gelprobe wurde auf eine PVDF Membran geblottet und die Bande bei 6,5 kDa zum Ansequenzieren über einen Edman-Verdaus gebracht. Die Massenspektrometrie ergab, dass das richtige Fragment in der Fraktion 9 zwar enthalten ist (Masse A $\beta_{40}$ : (4327 + 1) Da), dass aber neben diesem Fragment sehr viele weitere Peptide zu erkennen sind.





Die N-terminale Ansequenzierung der einzig sichtbaren Bande bei 6,5 kDa erbrachte die Existenz eines His<sub>6</sub>-Tags am Fragment. Es konnte jedoch kein Fragment der Enterokinase



oder des N-Terminus des Fusionsproteins gefunden werden, das mit einer der anderen Molekülmassen aus dem Spektrum in Korrelation zu bringen gewesen wäre. Weiterhin wurden zur Kontrolle die Proteine ausgehend von pET14b CAT und pET14b GST exprimiert und über NiNTA Chromatographie aufgereinigt und mit Enterokinase inkubiert. Dabei war jedoch kein Verdau der Fusionspartner der Aβ-Peptide feststellbar.

Aufgrund dieses Widerspruchs wurde ein Verdau von GST Aβ<sub>40</sub> auf zwei verschiedenen Westernblots mit einem Antikörper sowohl gegen einen His<sub>6</sub>-Tag (HisProbe, SantaCruz) als auch gegen das Amyloid selbst analysiert (Abbildung 5.20). Dabei wird deutlich, dass

bei der Reaktion auf den Amyloidantikörper erst durch sehr lange Belichtung eine Färbung auch bei ca. 4kDa entsteht, neben der viel stärkeren Bande bei 6,5 kDa. Auf ungefähr dieser Höhe zeigt sich eine leichte Färbung beim Blot gegen den His<sub>6</sub>-Tag. Diese Überlappung kann das Ergebnis des Edman-Abbaus erklären.

Aufgrund der hiermit festgestellten Unspezifität und der sehr geringen Ausbeute der Enterokinase beim Verdau des vorliegenden Konstrukts musste auf eine alternative Protease ausgewichen werden.

### 5.2.5 Abspaltung des amyloid- $\beta$ Peptids durch TEV Protease

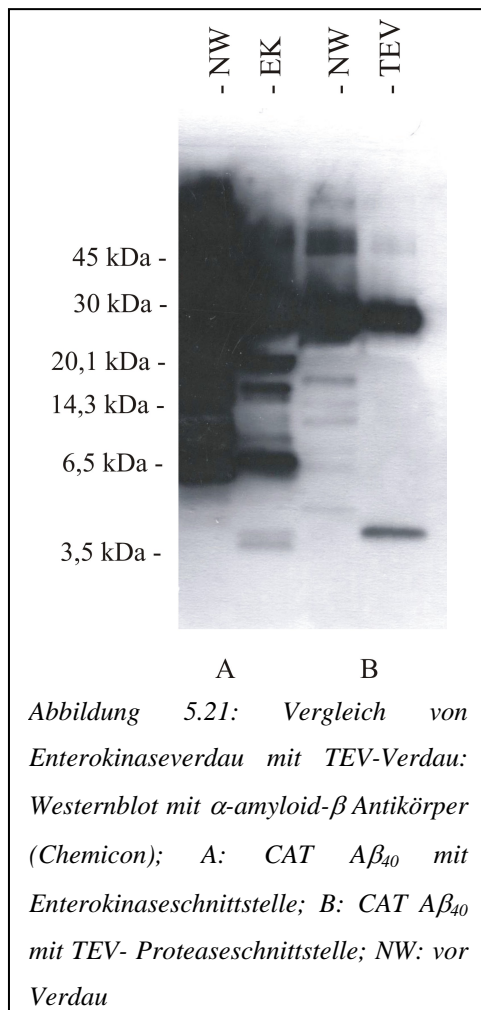
Da Effektivität und Spezifität der Enterokinasespaltung unzureichend war, wurde auf eine alternative Protease umgestellt. Die Protease des Tobacco Etch Virus (TEV-Protease) toleriert neben der kanonischen Spaltstelle ENLYFQ/G, wobei vor dem Glycin die Spaltung erfolgt, auch eine andere Aminosäure C-terminal von der Spaltstelle (Hortschansky *et al.*, 2005). Es wurde gezeigt, dass A $\beta$ <sub>40</sub> mit dem N-terminalen Aspartat von einem Fusionsprotein, dem maltosebindenden Protein (MBP), effektiv durch die TEV Protease abgespalten werden kann. Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit nach Möglichkeiten gesucht wurde, Peptide zellfrei herstellen zu können, wurde diese Proteaseschnittstelle auf ein Fusionsprotein mit CAT, dem Fusionspartner, der sich schon bei der Verwendung einer Enterokinaseschnittstelle als sehr effektiv erwiesen hatte, übertragen.

Im Folgenden werden verschiedene Fusionskonstrukte beschrieben, die zu diesem Zweck hergestellt wurden.

#### 5.2.5.1 Das Konstrukt pET14bCAT A $\beta$ <sub>40</sub> TEV

Beim initialen Konstrukt wurde mittels PCR 5' an die Nukleotidsequenz des A $\beta$ <sub>40</sub> die Proteaseschnittstelle angehängt und über die BamH I Restriktionsschnittstelle hinter CAT in pET14b CAT eingefügt. Nach Deletion des Stopcodons 3' von CAT war damit die Fusion aus CAT und A $\beta$ <sub>40</sub> mit einer TEV-Proteaseschnittstelle vollendet.

Die Expression des Fusionsproteins erfolgte analog zur Expression der Proteine mit Enterokinaseschnittstelle (7.2.2.5). Das Protein wurde ebenfalls in 50 mM Tris pH 7,8 rückgefaltet. Dabei zeigte sich, dass ein großer Teil des Fusionsproteins während der Dialyse ausgefallen war. Der noch lösliche Anteil wurde mit TEV verdaut und danach ein Aliquot



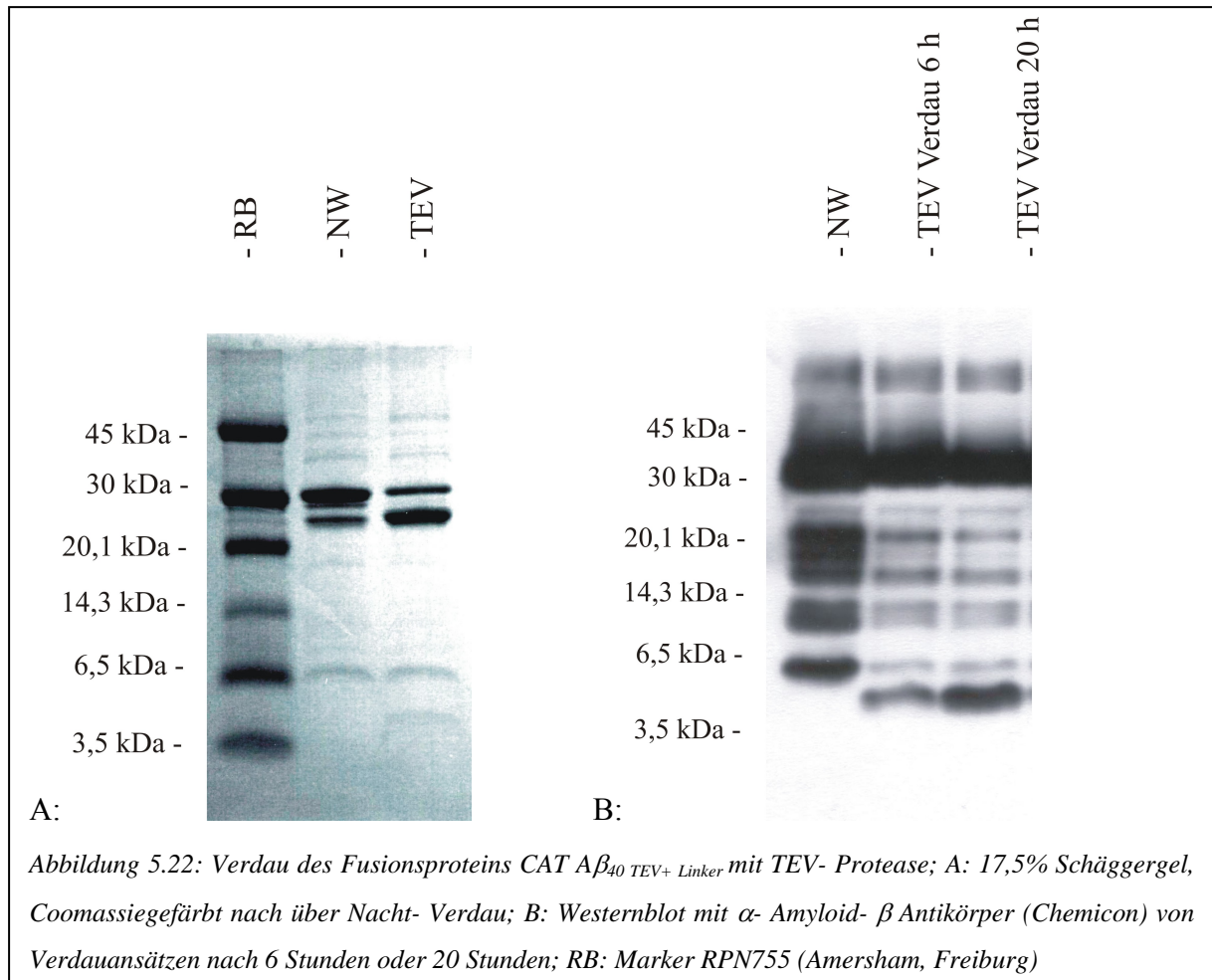
über einen Westernblot analysiert. Zum Vergleich wurden Proben des CAT  $A\beta_{40}$  mit Enterokinaseschnittstelle parallel mit Enterokinase verdaut und ebenfalls auf dem Westernblot analysiert (Abbildung 5.21). Dabei wurde deutlich, dass einerseits durch den Einsatz der TEV Protease im Vergleich zur Enterokinase bedeutend weniger Unspezifitäten entstehen und dass andererseits durch den Verdau eine einzelne Bande bei ca. 4 kDa aufgetreten ist. Um die Identität dieses entstandenen Peptids bestimmen zu können, wurde ein Verdau dieses Fusionsproteins mit dem Volumen 1 ml über Nacht angesetzt, lyophilisiert und in 20  $\mu$ l 2x SDS Probenpuffer aufgenommen. Diese Gelprobe wurde auf einem 17,5% Schäggergel (7.2.3.5) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet (vgl. 7.2.3.10). Die Ansequenzierung der Bande bestätigte, dass es sich dabei um  $A\beta_{40}$  handelte.

Neben der schlechten Rückfaltbarkeit des Proteins bestand ein weiteres schwerwiegendes Problem darin, dass die Expression dieses Fusionskonstrukts im System der *in-vitro* Transkription/Translation im Vergleich zu den übrigen Konstrukten nur im sehr geringen Umfang möglich war.

#### 5.2.5.2 Das Konstrukt pET14bCAT $A\beta_{40}$ TEV + Linker

Aufgrund der begrenzten Löslichkeit des Proteins bei der Rückfaltung wurde vor der TEV Schnittstelle analog zu den Konstrukten mit der Enterokinaseschnittstelle eine repetitive Glycin-Alanin-Sequenz als Linker eingebaut, in der Erwartung, dass dadurch die Faltung des Proteins auf dasselbe Niveau hin wie bei den Fusionsproteinen mit Enterokinaseschnittstelle verbessert werden könnte. Auch dieses Protein wurde in Rosetta (DE3) pLysS exprimiert und aufgereinigt (7.2.2.5). Bei der Rückfaltung des Proteins konnte festgestellt werden, dass sich die löslich vorliegende Menge an Fusionsprotein deutlich erhöht hatte, wenn auch noch





immer nicht in dem Umfang, wie bei dem Protein mit Enterokinaseschnittstelle. Der Verdau mit TEV wurde anschließend über SDS-PAGE mit Coomassiefärbung und über Westernblot analysiert (Abbildung 5.22). Wie zu erkennen ist, entsteht auch bei diesem Konstrukt wie bei pET14bCAT Aβ<sub>40</sub> TEV ein Peptid von der richtigen Größe. Demnach besteht mit diesem Fusionskonstrukt die Möglichkeit, Aβ<sub>40</sub> zellfrei zu präparieren.

### 5.2.5.3 Das Konstrukt pK7 CAT Aβ<sub>40</sub> TEV + Linker

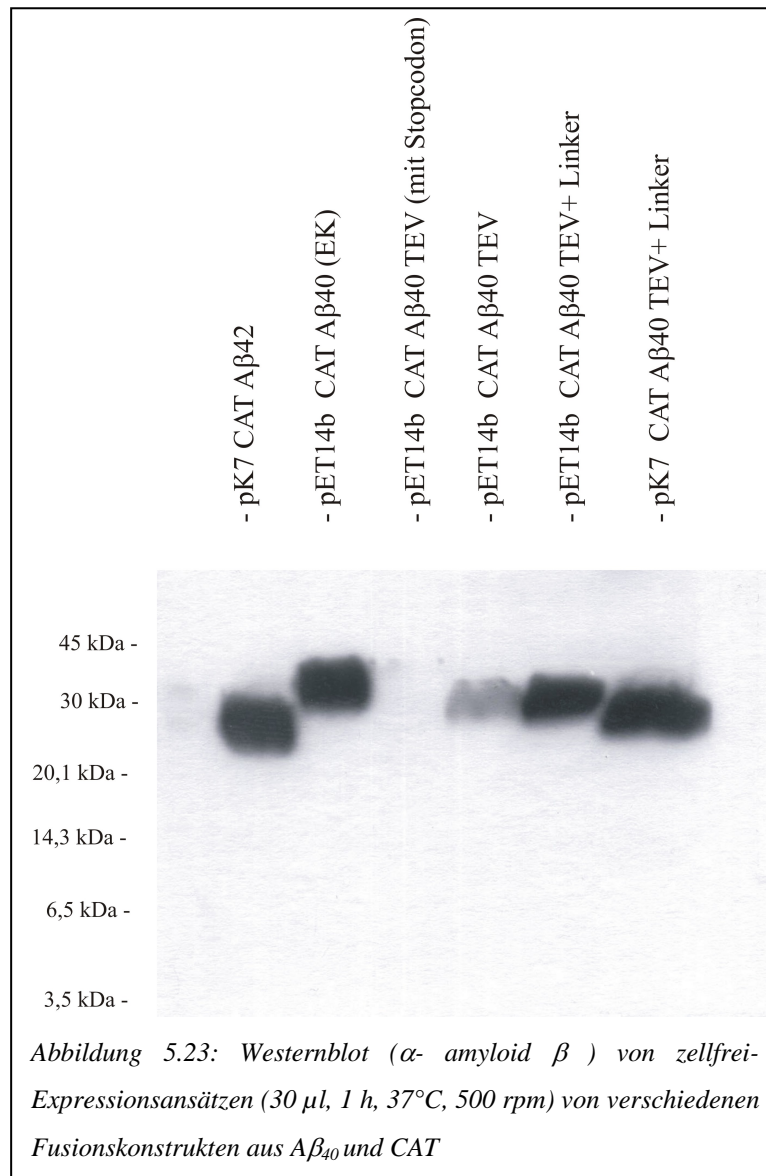
Wegen der begrenzten Rückfaltbarkeit des unter 5.2.5.2 vorgestellten Konstrukts wurde nach einer Möglichkeit gesucht, das Fusionsprotein aus CAT und Aβ<sub>40</sub> schon im löslichen Zustand zu exprimieren, um so eine Rückfaltung unnötig zu machen. Da bekannt war, dass bei einer zellfreien Expression die Konstrukte teilweise löslich vorlagen (im Gegensatz zur zellulären Expression), wurde versucht, die Expressionsrate des gesamten Fusionsproteins zu erhöhen. Ein Problem dabei war, dass CAT mit N-terminalem His<sub>6</sub>-Tag nur ca. 100 µg/ml an Gesamtexpressionsrate erreicht (siehe 4.2.2.), wohingegen pK7CAT weit höhere

Konzentrationen im Batchansatz erreichen kann (Kigawa *et al.*, 1999, Hofweber 2003). Aus diesem Grund wurde die Fusionskassette aus pET14bCAT A $\beta$ <sub>40</sub> TEV + Linker mittels PCR in den Vektor pK7 ligiert und dadurch der N-terminale His<sub>6</sub>-Tag entfernt.

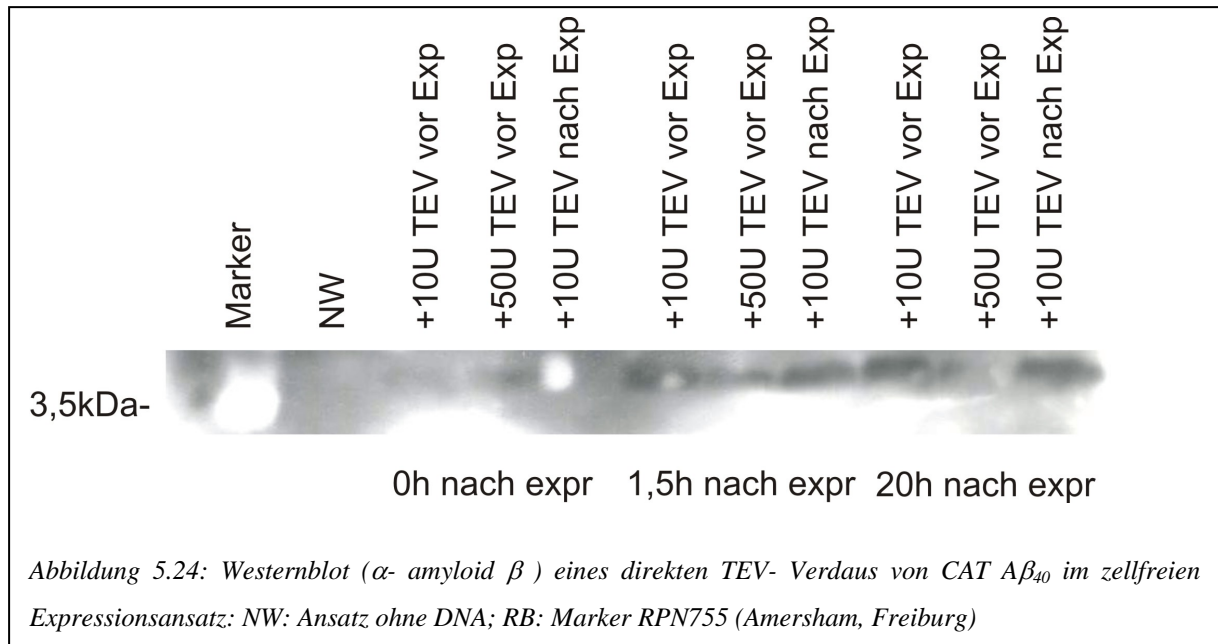
Bei paralleler Expression von pET14bCAT A $\beta$ <sub>40</sub> TEV + Linker und pK7 CAT A $\beta$ <sub>40</sub> TEV + Linker wurde jedoch festgestellt (Westernblot Abbildung 5.23), dass die Gesamtexpressionsrate

damit nicht erhöht werden konnte.

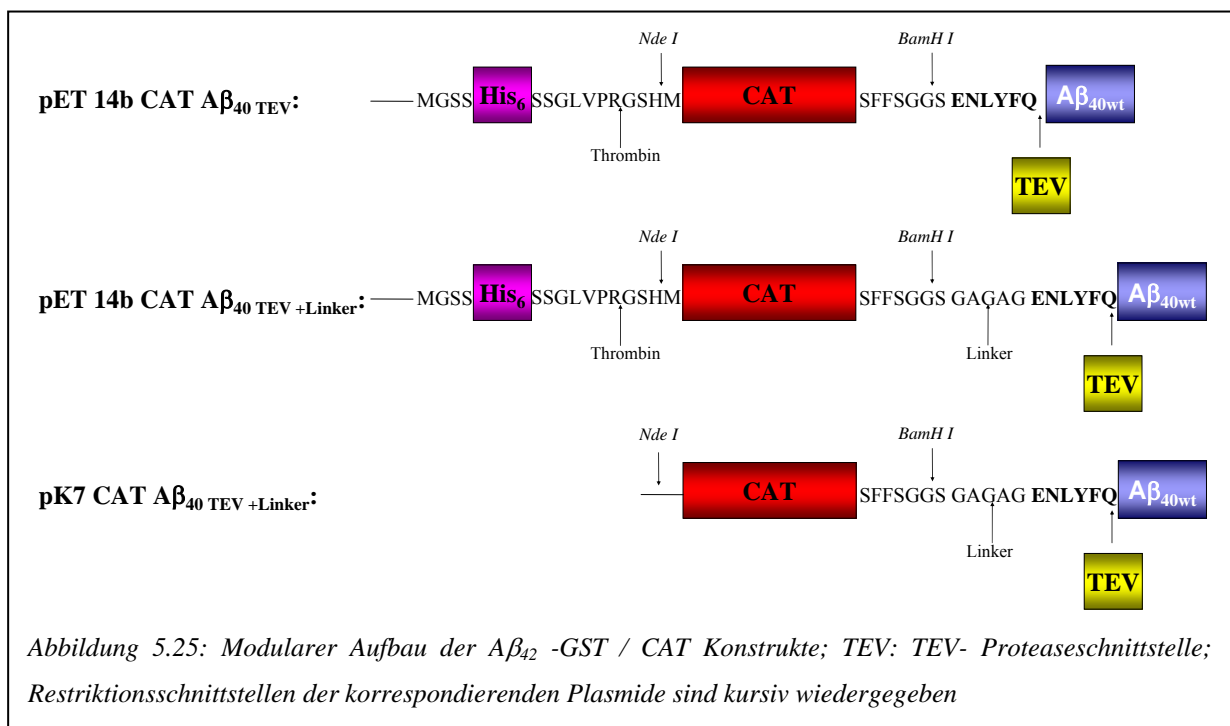
Weiterhin wurde vom Überstand der Reaktion ein CAT Assay (7.2.1.6) im Vergleich zu einem parallelen Expressionsansatz von pK7 CAT durchgeführt. Dabei konnten nur ca. 20% der möglichen Höchstmenge, nämlich der Menge an CAT ohne A $\beta$ <sub>40</sub>, löslich hergestellt werden, sodass es nicht effizient war, mit einem so geringen Prozentsatz an markiertem Protein weiterzuarbeiten. Trotzdem wurde in einem Experiment versucht, das Fusionsprotein, das sich ohne His<sub>6</sub>-Tag nur sehr schwer aus dem Batchansatz aufzureinigen lässt, direkt im Ansatz zu



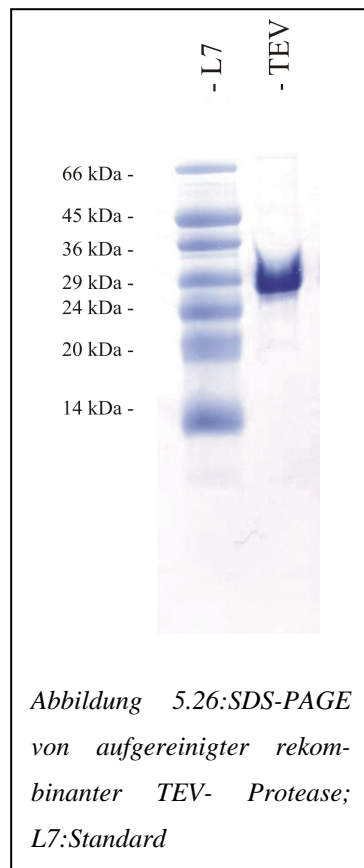
verdauen. Dazu wurden zu 90  $\mu$ l Batchansatz entweder 10 U oder 50 U vor oder nach der Expression zugefügt und Proben nach 0, 1, 5 oder 20 Stunden genommen. Die Proben wurden auf einem Westernblot aufgetragen (Abbildung 5.24), wobei ein sehr ineffizienter Verdau zu beobachten war. Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass im Batchansatz andere Pufferbedingungen vorherrschen als sie für die TEV Protease ideal sind.



Aus diesem Grund war das Konstrukt codiert auf pET14bCAT  $A\beta_{40}$  TEV + Linker (siehe Abbildung 5.25) das am besten geeignete, um eine Präparation des  $A\beta$ -Peptids mit 40 Aminosäuren in Angriff zu nehmen.



## 5.2.6 Die präparative Aufreinigung



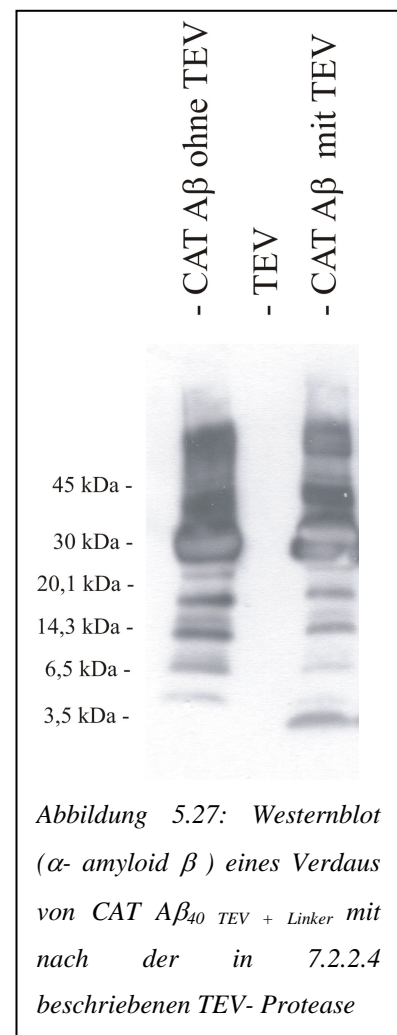
Wie im Kapitel 5.2.5.2 bereits dargelegt wurde, ist das Fusionskonstrukt basierend auf dem Plasmid pET14b CAT A $\beta$ <sub>40</sub> TEV + Linker der optimale Ausgangspunkt für eine Präparation von A $\beta$ -Peptiden. Im Folgenden wird die Abspaltung und die Aufreinigung des Peptids dargelegt, ausgehend von vollständig in 8 M Harnstoff entfaltetem Fusionsprotein. Da deshalb kein Unterschied zwischen zellulär oder zellfrei hergestelltem Protein zu erwarten war, wurde das Protein, wie in 7.2.2.5 beschrieben, in *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS hergestellt und denaturiert über Nickelchelate-Chromatographie aufgereinigt. Um präparativ arbeiten zu können, war es nötig, die Protease zum Abspalten des Fusionspartners in großem Umfang zur Verfügung zu haben.

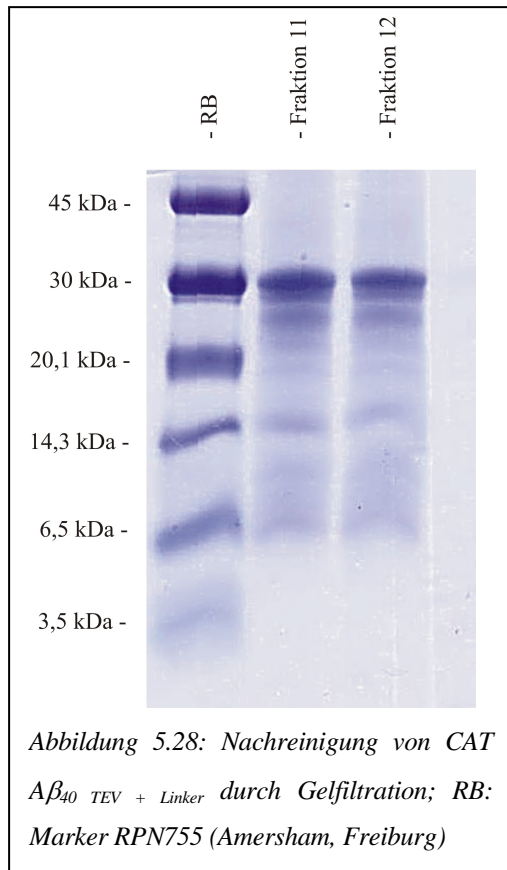
Dazu wurde diese ausgehend vom Plasmid pET9d TEV S229V in *E. coli* BL21 DE3 pLysS exprimiert und über

NiNTA-Chromatographie aufgereinigt. Der Erfolg der Aufreinigung ist in Abbildung 5.26 dokumentiert.

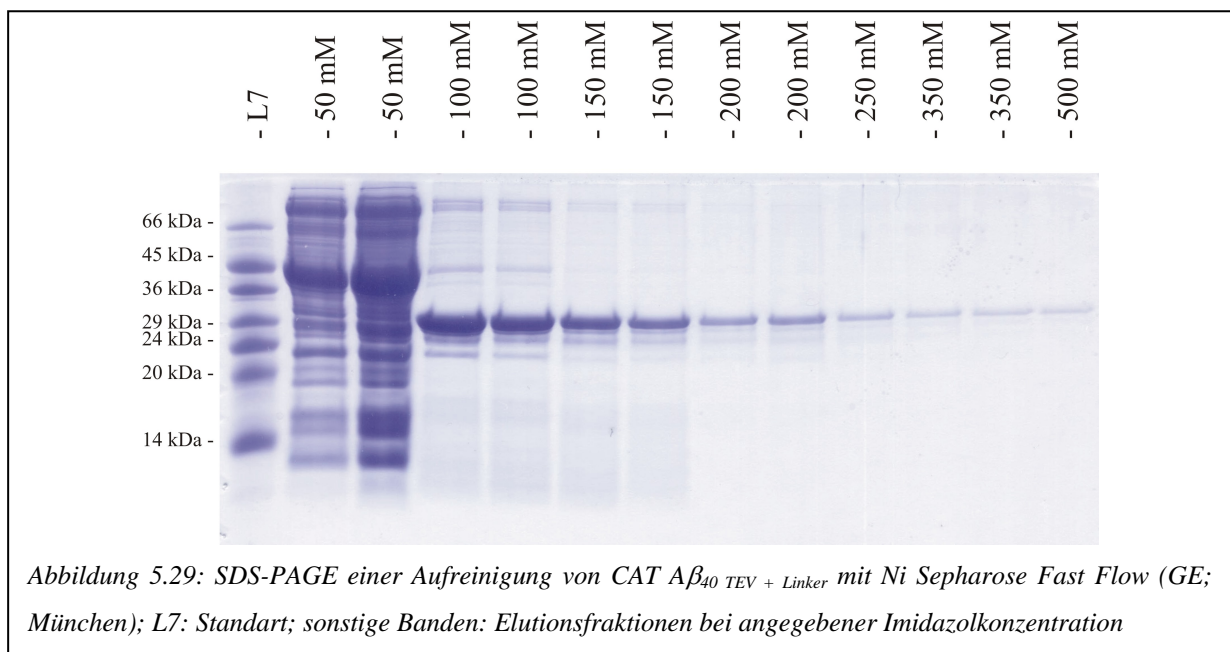
Die so hergestellte Protease wurde mit in 50 mM Tris pH 7,8 rückgefaltetem CAT A $\beta$ <sub>40</sub> TEV + Linker zur Reaktion gebracht. Der Verdau verlief über Nacht bei Raumtemperatur. Der Ansatz wurde über Westernblot und SDS-PAGE analysiert. Dabei war zu erkennen, dass die selbst hergestellte Protease ebenso wie die zuvor erworbene ein Fragment von ca. 4 kDa abspalten kann (Abbildung 5.27).

Wie in Abbildung 5.22 A zu erkennen ist, konnte durch die Aufreinigung über Nickelchelatchromatographie keine perfekte Reinheit des Fusionsproteins CAT A $\beta$ <sub>40</sub> TEV + Linker erzielt werden. Dies zeigt sich auch im Westernblot nach dem Verdau (Abbildung 5.27). Um die Reinheit des Fusionsproteins zu erhöhen und dadurch die finale





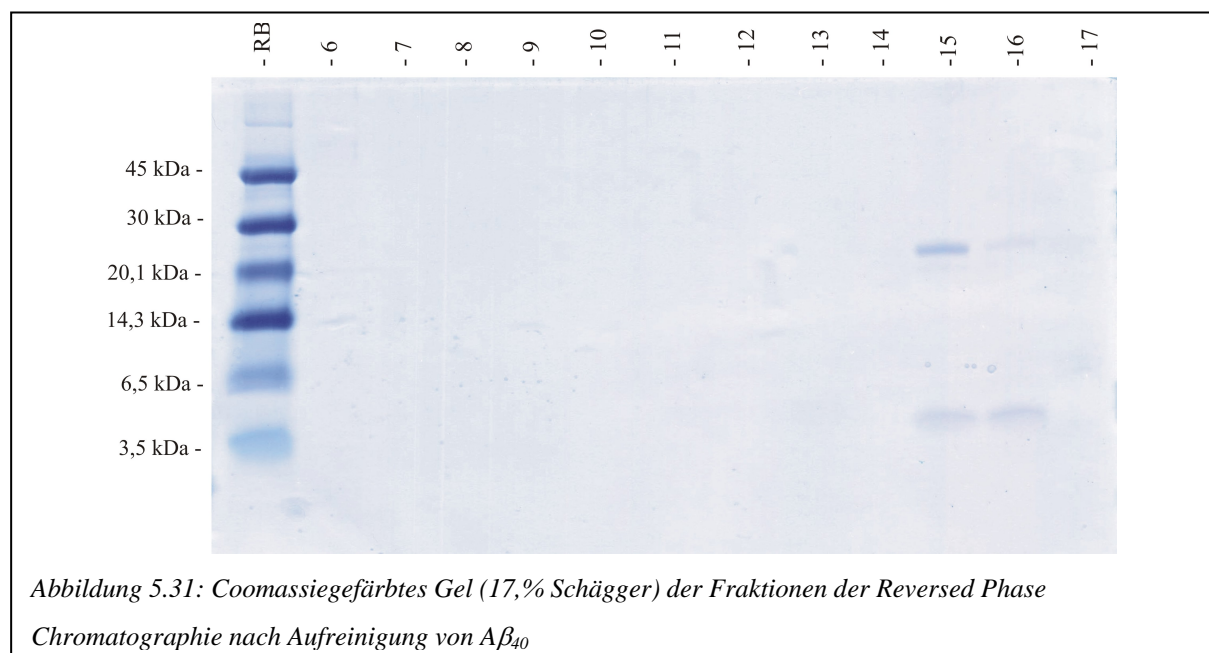
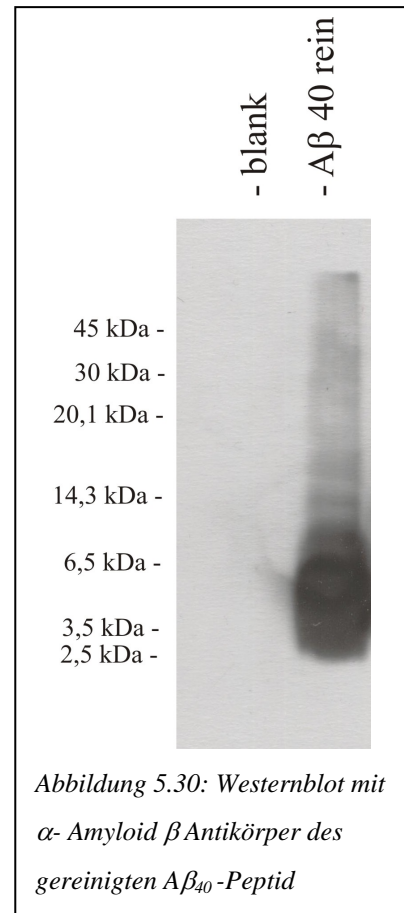
Aufreinigung nach dem Proteaseverdau zu vereinfachen, wurde versucht, über Größenausschlusschromatographie die Verunreinigungen abzutrennen. Dazu wurde das rückgefaltete Protein auf eine in 50 mM Tris HCl pH 7,8 äquilibrierte Superdex 200 16/60 Säule geladen und die beiden proteinhaltigen Fraktionen auf einem 17,5% Schäggergel aufgetragen (Abbildung 5.28). Dabei konnte festgestellt werden, dass die Reinheit des Fusionsproteins auf diese Weise nicht erhöht werden konnte. Deshalb wurde versucht, mit alternativem Säulenmaterial die Reinheit der Präparate zu erhöhen, und zwar mit Ni Sepharose 6 Fast Flow von GE (München), mit dem sowohl über pH Sprung (nicht gezeigt) als auch über einen Imidazolgradienten (Abbildung 5.29) versucht wurde, die Reinheit zu erhöhen.



Da dies wiederum keine Verbesserung der Reinheit erbrachte, war eine abschließende Aufreinigung mittels „Reversed Phase“-Chromatographie unumgänglich.



Um das Peptid präparativ aufzureinigen, wurden 15 mg des aufgereinigten Fusionsproteins rückgefaltet (Volumen 10 ml) und über Nacht mit 1 ml der in Abbildung 5.26 gezeigten TEV-Präparation bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei fiel das Peptid zusammen mit einem Teil des Fusionspartners aus. Das ausgefallene Protein wurde durch Zentrifugation abgetrennt. Nach Lösen des Niederschlags in 125 mM NaOH und Neutralisieren mit RP- HPLC Auftragspuffer (10 mM  $\text{NH}_4\text{OH}$ /  $\text{HCOOH}$  pH9) wurden die TEV-Protease, unverdautes Fusionsprotein und der abverdaute CAT-Tag (alle mit  $\text{His}_6$ -Tag) durch NiNTA-Chromatographie abgetrennt. Der  $\text{A}\beta_{40}$ -Peptid-haltige Durchlauf wurde auf eine RESOURCE RPC Säule (Amersham, Freiburg) geladen und die Fragmente durch einen Acetonitrilgradienten eluiert.  $\text{A}\beta_{40}$  eluierte bei ca. 35% Acetonitril von der Säule. Die Fraktionen wurden eingetrocknet (Speedvac) und in 60  $\mu\text{l}$  1xSDS Probenpuffer aufgenommen. Je 12  $\mu\text{l}$  wurden auf die Gele (Abbildung 5.30 und 5.31) aufgetragen). Die Identität des Peptids wurde durch Edman-Abbau verifiziert.



## 5.3 Diskussion

### 5.3.1 Die direkte Expression der amyloid- $\beta$ Peptide

Um zu testen, ob im zellfreien System Peptide von ca. 40 Aminosäuren Länge exprimierbar sind, wurde die Sequenz des A $\beta$ -Peptids in pIVEX 2.3 MCS kloniert. Dafür wurde ein His<sub>6</sub>-Tag C-terminal angefügt. Es wurde sowohl die originale Sequenz aus dem humanen Organismus, als auch eine auf die Expression in *E. coli* hin optimierte Version (hergestellt von der Firma GENEART, Regensburg) verwendet. Von Vorteil an diesem optimierten Gen ist, dass Sekundärstrukturen auf der mRNA vermieden werden und der GC-Gehalt in Abstimmung mit dem Codongebrauch angepasst ist. Die Zielsequenz wäre somit, abgesehen vom His<sub>6</sub>-Tag und dem Startmethionin, in Reinform herstellbar. Wie in Abbildung 5.5 erkennbar, ist auch bei genauester Analytik mittels Westernblot mit sehr hoher Belichtungsdauer keine Expression zu beobachten. Es ist weder auf der zu erwartenden Höhe bei ca. 5 kDa noch auf der ganzen Bande, wie bei der chemisch hergestellten Positivkontrolle, eine Färbung zu beobachten.

Dieses Ergebnis kann auf verschiedene Ursachen zurückgeführt werden. Eine Fehlfunktion des im Labor hergestellten Systems kann ausgeschlossen werden, da auch der käufliche Kit (RTS 500, Roche Mannheim) nach 20 Stunden Expressionsdauer keine Spuren von A $\beta$ <sub>42</sub> erbrachte. Weiterhin ist aufgrund der Verwendung von optimierten Gensequenzen unwahrscheinlich, dass mRNA Sekundärstrukturbildung einen inhibitorischen Einfluss auf die Expression gehabt haben könnte (vergleiche 3.3). Ein weiterer möglicher Grund könnte in einer eventuellen Toxizität der Zielpeptide für den Expressionsapparat von *E. coli* liegen. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde zu Expressionsansätzen des Reportergens CAT amyloid- $\beta$  Peptid zugesetzt (siehe Abbildung 5.6). Es ist zu erkennen, dass die Expression durch den Zusatz des Peptids nicht beeinflusst wird, woraus zu schließen ist, dass das Peptid per se nicht toxisch auf die Transkription/Translation wirkt. Weiterhin wurde zu der Expression von CAT das Plasmid pIVEX 2.3 MCS A $\beta$ <sub>42</sub> zugesetzt, wobei ein Abfall der Expressionsrate um ca. 70% beobachtet werden konnte. Dieser Abfall kann zwei verschiedene Gründe haben. Zum einen ist es möglich, dass die Aktivität der T7 RNA Polymerase limitierend ist, da diese zwei verschiedene mRNAs herstellen muss, und zum anderen besteht die Möglichkeit, dass das naszierende A $\beta$ -Peptid die Austrittsstelle der Polypeptidkette am Ribosom verstopft und dieses damit inaktiviert. Für die zweite Theorie spricht, dass der

Abfall mehr als 50% beträgt, wie er bei einer Halbierung der T7 RNA Polymeraseaktivität zu erwarten wäre. Somit konnte mit diesem Experiment geklärt werden, dass die Zellfreiexpression in Gegenwart von A $\beta$ -Peptid und des entsprechenden Plasmids ablaufen kann. Warum die Expression des Peptids selbst jedoch nicht abläuft, bleibt unklar. Vermutlich führt die A $\beta$ -Sequenz durch ihre Aggregationsneigung bereits am Ribosom zu Problemen.

### 5.3.2 Die Auswahl eines geeigneten Expressionskonstrukts

Aufgrund der nicht gegebenen Möglichkeit, das Peptid direkt zellfrei zu exprimieren, wurde nach Möglichkeiten gesucht, das Peptid N-terminal flankiert mit anderen Sequenzen zu exprimieren. Es wird dabei davon ausgegangen, dass durch das Anfügen einer Hilfssequenz, von der bekannt ist, dass sie gut exprimiert, auch die Sequenz des A $\beta$ -Peptids mit exprimiert wird. Dafür stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Zum einen können kurze Fusions- und Aufreinigungstags verwendet werden, aber auch größere Proteine, die sich bei der Expression von Peptiden in *E. coli* bereits bewährt haben (Smith *et al.*, 1988, Bassford *et al.*, 1979). Die Verwendung von kurzen Fusionstags wäre vorteilhaft, da dabei keine großen Mengen an stabilen Isotopen verschwendet werden würden durch den Einbau in den Fusionspartner. Die Expressionsrate dieser Konstrukte blieb jedoch hinter den Erwartungen (siehe 5.2.3). So konnte His<sub>6</sub>-A $\beta$ <sub>40</sub> nur in Spuren nachgewiesen werden (Abbildung 5.11). Je länger das Fusionskonstrukt wurde, vor allem erkennbar an His<sub>6</sub>-Flag-A $\beta$ <sub>40</sub> (siehe Abbildung 5.10), umso mehr Protein konnte hergestellt werden. Flag-A $\beta$ <sub>40</sub>, was noch kürzer als His<sub>6</sub>-A $\beta$ <sub>40</sub> ist, konnte hingegen nicht mehr nachgewiesen werden. Dies lässt den Schluss zu, dass die Expression von Peptiden allgemein erst ab einer gewissen Mindestlänge auch im zellfreien System möglich ist. Da demgegenüber deutlich wurde, dass vor allem die Expression von CAT kaum durch die C-terminale Fusion mit dem A $\beta$ -Peptid beeinträchtigt wird (Abbildung 5.13), war es notwendig, die weiteren Präparationsversuche von A $\beta$ -Peptiden basierend auf der Fusion mit Trägerproteinen durchzuführen, obwohl dadurch viel von den markierten Aminosäuren in uninteressante Fusionspartner eingebaut werden würde. Vor allem die Fusion mit Chloramphenicol-Acetyltransferase stellte sich als vielversprechend heraus, da zum einen CAT eine der höchsten bekannten Expressionsraten im auf *E. coli* basierenden System der *in-vitro* Transkription/Translation aufweist, und zum anderen im Vergleich zu GST die Expression durch die Fusion kaum beeinträchtigt wurde (Abbildung 5.13).



### 5.3.3 Die Auswahl der Proteaseschnittstelle

Um das A $\beta$ -Peptid von den N-terminal angefügten Fusionspartnern abzuspalten, war die Insertion von geeigneten Proteaseschnittstellen nötig. Dazu waren vor allem die Proteasen Faktor Xa und Enterokinase geeignet, da sie keine Spezifität im Bezug auf die Aminosäuren C-terminal von der Spaltstelle besitzen. Datenbanksuchen (<http://merops.sanger.ac.uk>) ergaben, dass für die Abspaltung der Sequenz von A $\beta$  ansonsten nur die humane  $\beta$ -Sekretase möglich ist, diese aber nicht zur Verfügung steht, da sie ein Membranprotein darstellt. Die Verwendung von Enterokinase war besonders vielversprechend, da beschrieben ist (siehe Roche Manual), dass sie Detergentien und hohe Konzentrationen an Harnstoff (diesen in Kombination mit Methylamin) tolerieren kann. So bestand die Möglichkeit, eventuell stark aggregierende Versionen von A $\beta$  löslich zu halten, vor allem von A $\beta_{42}$ . Nach der Insertion der Schnittstelle (Schema siehe Abbildung 5.12) konnte eine hohe Expression und ein gutes Rückfaltverhalten festgestellt werden. Die Spaltung jedoch war sehr ineffizient und unspezifisch (siehe Abbildungen 5.15 und 5.20). So waren im Massenspektrum neben der gesuchten Substanz noch viele andere Bruchstücke feststellbar, und zwar in einer solchen Konzentration, dass beim Edman Abbau ein anderes Fragment ansequenziert wurde.

Aus diesem Grund war die Anwendung einer anderen Protease notwendig. Hortschansky *et al.*, 2005 berichteten von einer Abspaltbarkeit von A $\beta$ -Peptiden vom maltosebindenden Protein durch die TEV-Protease (Parks *et al.*, 1994, Kapust *et al.*, 2002). Nachdem diese Schnittstelle in CAT A $\beta$  ohne einen Linker eingefügt wurde, konnte festgestellt werden, dass die Expression davon stark beeinträchtigt wurde (siehe Abbildung 5.23). Weiterhin war die Rückfaltbarkeit und die Stabilität des rückgefalteten Proteins stark reduziert im Vergleich zu dem Fusionskonstrukt mit Enterokinaschnittstelle und entsprechendem Linker (vergleiche Abbildungen 5.12 und 5.25). Deshalb wurde ebenfalls ein repetitiver Linker (GAGAG) eingefügt (siehe Abbildung 5.25). Dadurch konnte die Expressionsmenge wieder auf das Ausgangsniveau angehoben werden (siehe Abbildung 5.23) und die Rückfaltbarkeit verbessert werden. Das Stabilitätsniveau des Konstrukts pET14 CAT A $\beta_{40}$  (Abbildung 5.12) konnte zwar nicht mehr erreicht werden, jedoch war die Spezifität und Effektivität der TEV Proteasereaktion bedeutend höher als die der Enterokinase. Ein Grund für die suboptimale Stabilität des Fusionsproteins CAT A $\beta_{40}$  TEV+Linker kann darin liegen, dass die A $\beta$ -Peptide untereinander Aggregate bilden und zu präzipitieren beginnen. Aus diesem Grunde war es nötig, TEV Protease überzutitrieren (7.2.2.4), um die Spaltung möglichst schnell durchführen zu können. Eine Entfernung der His<sub>6</sub>-Tags (pK7 CAT A $\beta_{40}$  TEV+Linker) vom Fusionskonstrukt

erbrachte weiterhin keine Erhöhung der Expression (Abbildungen 5.23 und 5.24). Dies war erwartet worden, da CAT alleine (ca. 300 µg/ml; Hofweber 2003) deutlich höher exprimiert als CAT mit einem N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag (ca. 100 µg/ml).

#### 5.3.4 Die Präparation von Aβ<sub>40</sub>

Die durchgeführten Experimente haben gezeigt, dass eine Präparation von Aβ-Peptiden im zellfreien System ausgehend von einer Fusion mit Chloramphenicol-Acetyltransferase als optimal anzusehen ist. Ebenso hat sich gezeigt, dass die Existenz eines His<sub>6</sub>-Tags die Expression zwar reduziert, ein Aufreinigungstag, der auch unter denaturierenden Bedingungen zu verwenden ist, jedoch unumgänglich ist. Als geeignete Protease stellte sich die TEV-Protease heraus, da die Spezifität für die C-terminale Aminosäure nach der Schnittstelle gering ist. Um eine akzeptable Rückfaltung erreichen zu können, war die Insertion einer Linkersequenz nötig, sodass das optimale Konstrukt für die Präparation von Aβ-Peptiden pET14b CAT Aβ<sub>40</sub> TEV+ Linker darstellte (Abbildung 5.25). Zur Aufreinigung wurde das Säulenmaterial Ni NTA Superflow (Qiagen, Hilden) verwendet. Dabei verbleiben jedoch deutliche Verunreinigungen in den Elutionsfraktionen (Abbildung 5.28). Auch die Verwendung von modernerem Säulenmaterial (Ni Sepharose von GE Healthcare, München) vermochte den Reinigungseffekt nicht erhöhen (Abbildung 5.29). Weiterhin war es nicht möglich, die Reinheit der Präparation durch Gelfiltration zu erhöhen (Abbildung 5.28). Aus diesen Gründen muss davon ausgegangen werden, dass die noch vorhandenen Polypeptide mit dem Zielprotein Aggregate bilden und nicht weiter von diesen befreit werden können. Die Rückfaltung des in Harnstoff entfalteten Fusionsproteins war erfolgreich, die Ausbeute betrug ca. 80 %. Die Stabilität des rückgefalteten Proteins jedoch war begrenzt, sodass die Spaltung mit der Protease (TEV) sehr schnell durchgeführt werden musste. Dazu wurde die Protease stark übertitriert (siehe 5.2.6), was in guten Spaltungsergebnissen resultierte (Abbildung 5.22 und 5.27). Das Peptid fiel bei der Spaltung jedoch mit weiteren Komponenten des Ansatzes aus. Dieser Niederschlag musste durch Basenbehandlung solubilisiert werden. Durch die daran anschließenden Reinigungsschritte (NiNTA und RP-HPLC) konnte das Peptid Aβ<sub>40</sub> zwar vollständig aufgereinigt werden, jedoch sank durch die Reinigungsverluste die Ausbeute sehr stark ab. Der Grund dafür ist in der starken Aggregationstendenz der Aβ-Peptide zu suchen. Diese zeigte sich wiederum im Westernblot (Abbildung 5.30), da der Antikörper, wie in

Abbildung 5.5 bereits gezeigt, auf beinahe die gesamte Gelspur reagiert, was auf die extreme Aggregationstendenz des A $\beta$ -Peptids zurückgeführt wird.

Somit kann abschließend festgestellt werden, dass mit Hilfe der zellfreien Proteinexpression auch stark aggregierende Peptide erfolgreich, wenn auch in geringem Maße, synthetisiert werden können.

Bei dem in dieser Studie gewählten A $\beta$ -Peptid, welches sogar unter denaturierenden Bedingungen kaum vollständig monomer vorliegt (Kim, Muresan *et al.*, 2004), sind jedoch die weiteren Aufreinigungsschritte nach der Spaltung so verlustreich, dass eine Markierung mit stabilen Isotopen extrem kostenintensiv wäre. Da im Verlauf des Projekts A $\beta$ -Peptid zu attraktiven Preisen am Markt erschienen ist, wurde von einer Markierung abgesehen. Es ist jedoch möglich, unter Verwendung der hier vorgestellten Fusionskassetten (vor allem ausgehend von Chloramphenicol-Acetyltransferase) Peptide, die sonst nicht herstellbar sind, markiert mit stabilen Isotopen herzustellen. Eine geringere Aggregationstendenz als bei den hier vorgestellten amyloid- $\beta$  Peptiden sollte auch die Aufreinigung nach der Expression weniger stark beeinträchtigen.

## 6 Materialien

### Chemikalien

Die Grundausrüstung an Chemikalien wurde von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Gerbu Boitechnik (Gaiberg), Roche (Mannheim), Serva (Heidelberg), Roth (Karlsruhe), PeqLab Biotech (Erlangen), Pharma-Waldhof (Düsseldorf), Sigma Chemicals (Steinheim) und USB (Cleveland / Ohio) im Reinheitsgrad *pro analysi* bezogen.

### Puffer und Lösungen

CAT-Testlösung:	100 mM Tris/HCl (pH=7,8) 0,1 mM Acetyl-CoA 0,1 mM Chloramphenicol 0,4 mg/ml DTNA (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoesäure)
Coomassie-Färbelösung:	0,4 g Coomassie R 250 0,1 g Coomassie G 250 85 ml Ethanol 10 ml Methanol 20 ml Essigsäure 85 ml H <sub>2</sub> O
Coomassie-Entfärber:	40 ml Ethanol 20 ml Essigsäure 140 ml H <sub>2</sub> O
CSP-Aufschlusspuffer:	50 mM Tris / HCl pH 8,0 1 mM DTT 1 mM EDTA

DEPC-H <sub>2</sub> O:	0,1 % DEPC in vollentsalztem Wasser herstellen Ü.N. auf 37°C, leicht schüttelnd Autoklavieren Auf 4°C lagern	
LMY:	<i>E. coli</i> tRNA	0,45 mg/ml
	DTT	4,75 mM
	ATP	3,28 mM
	GTP, CTP, UTP	je 2,33 mM
	Folat	0,09 mM
	cAMP	1,73 mM
	NH <sub>4</sub> OAc	74,09 mM
	PEG 8000	10,86 %
	Kaliumglutamat	541,4 mM
	Hepes-KOH	155,4 mM
	Tyrosin	2,67 mM
Präinkubationspuffer:	293, 3 mM Tris / OAc (pH=8,2) 9,2 mM Mg(OAc) <sub>2</sub> 13,2 mM ATP (neutralisiert mit NaOH) 260 mM Creatinphosphat 4,4 mM jeder Aminosäure 1 mg/ml Creatinkinase in DEPC-H <sub>2</sub> O	
Puffer A:	50 mM Natriumphosphat pH 6,5 100 mM NaCl 1 mM EDTA	
Puffer B:	50 mM Tris / HCl, 100 mM KCl pH 7,8	
PVDF-Färbelösung:	0,2 % Coomassie R 250 50 % Methanol 10 % Eisessig	

PVDF-Entfärber:	50 % Methanol 10 % Eisessig
S30 Puffer:	14 mM Mg(OAc) <sub>2</sub> 60 mM KOAc 10 mM Tris/ OAc pH 8,2 1 mM DTT (1 mM β-Mercaptoethanol) in DEPC-H <sub>2</sub> O, RNase frei
Schägger-Anodenpuffer:	0,2 M Tris / HCl
Schägger-Kathodenpuffer:	0,1 M Tris / HCl pH 8,25 0,1 M Tricin 0,1 % SDS 0,001 % Natriumazid
SDS-Laufpuffer:	3,0 g Tris 14,4 g Glycin 1,0 g SDS H <sub>2</sub> O ad 1l
SDS-Probenpuffer:	57,5 mM Tris/ HCl pH 6,8 1,71 % SDS 6% Glycerin 0,1 M DTT 0,002 % Bromphenolblau
TAE:	4,84 g Tris 1,14 ml Eisessig 1 ml 0,5 M EDTA (pH=8) H <sub>2</sub> O ad 1l
TEC	40 mM Tris HCl, pH 7,0 oder 8,0 2 mM EDTA

TBS	10 mM Tris / HCl pH 8 150 mM NaCl
TBS Tween	TBS-Puffer 0,1 % Tween 20
TSS-Puffer:	85 % LB 10 % PEG 8000 5% DMSO 50 mM MgCl <sub>2</sub>
Westernblotpuffer	20 % Methanol 48 mM Tris 38 mM Glycin
TEV-Lysepuffer:	20 mM Tris pH 8.0- 10 mM Imidazole pH 8.0 150 mM NaCl 0.2% NP-40 2 mM Mercaptoethanol
TEV-Waschpuffer 1:	20 mM Tris pH 8.0- 10 mM Imidazole pH 8.0 150 mM NaCl 2 mM Mercaptoethanol
TEV-Waschpuffer 2:	20 mM Tris pH 8.0- 10 mM Imidazole pH 8.0 1 M NaCl 2 mM Mercaptoethanol
TEV-Waschpuffer 3:	20 mM Tris pH 8.0- 50 mM Imidazole pH 8.0 150 mM NaCl 2 mM Mercaptoethanol

TEV-Elutionspuffer: 20 mM Tris pH 8.0-  
330 mM Imidazole pH 8.0  
150 mM NaCl  
2 mM Mercaptoethanol  
10% Glycerin

TEV-Aufbewahrungspuffer: 20 mM Tris pH 8.0-  
150 mM NaCl  
2 mM DTT  
10% Glycerin

Harnstoffpuffer : 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   
10 mM Tris·/ HCl  
8 M Harnstoff  
eingestellt mit 8M NaOH oder 25% HCl auf den jeweiligen pH

## Medien

2x TY : 16 g Bacto Tryptone  
10 g Yeast Extract  
5 g NaCl  
 $\text{H}_2\text{O}$  ad 1l, sterilisieren

dYTG : 16 g Pepton  
10 g Yeast Extract  
5 g NaCl  
10 g Glycerin  
 $\text{H}_2\text{O}$  ad 1l, sterilisieren

LB : 10 g Bacto Tryptone  
5 g Bacto-Yeast  
10 g NaCl  
pH 7 mit NaOH, ad 1l, sterilisieren



M9TB :                      3l TB-Medium  
                                    30 g Bacto Tryptone  
                                    15 g NaCl  
                                    H<sub>2</sub>O ad 3l, sterilisieren  
                                    150 ml 20x M9 Salze  
                                    15 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
                                    30 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
                                    5 g NH<sub>4</sub>Cl  
                                    H<sub>2</sub>O ad 500 ml, sterilisieren  
                                    60 ml Glucose, sterilfiltriert  
                                    3 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>, sterilfiltriert

TB:                      900 ml TB-Medium  
                                    100 ml TB-Puffer

TB-Medium:              12 g Bacto Tryptone  
                                    24 g Bact-Yeast Extract  
                                    4 ml Glycerin  
                                    ad 900 ml, autoklavieren

TB-Puffer :              0,72 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
                                    0,17 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

## Geräte

ÄKTA FPLC	Amersham, Freiburg
AGILENT 2100 Bioanalyzer	Agilent, USA
GENios	TECAN, Männedorf, Schweiz
French Press	Aminco, SLM Instruments
Inkubator Multitron AJ 110/111/112	HT Infors, Basel, Schweiz
Massenspektrometer SSC 7000, Quadrupol	Finnigan MAT, Bremen
Schüttelwasserbad	Memmert, Schwabach
Sterile Werkbank MSC 12	Jouan, Wirchester, USA

Ultraschallgerät J17A	Branson, Schwäbisch Gmünd
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugen J-6B, Avanti JA20 und JA 25	Beckman, Unterschleißheim
Zentrifuge Universal 30 RF	Hettich, Tuttlingen

## Enzyme/ Proteine

Alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics, Mannheim
Anti RNase	Ambion, Frankfurt am Main
Amyloid $\beta$ -Peptid (42 Aminosäuren)	Prof. Dr. Penke, Szeged, Ungarn
Creatinkinase	Roche Diagnostics, Mannheim
DpnI	Stratagene, LaJolla, USA
Lysozym	Sigma Chemicals, Steinheim
Pfu Turbo	Stratagene, LaJolla, USA
Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor	Promega, Mannheim
BamH I	New England Biolabs, USA
Nde I	New England Biolabs, USA
Not I	New England Biolabs, USA
Sal I	New England Biolabs, USA
Sma I	New England Biolabs, USA
Xho I	New England Biolabs, USA
RQ1 RNase free DNase	Promega, Mannheim
T7 RNA Polymerase	Promega, Mannheim
Taq-Polymerase	Qiagen, Hilden

## Standards :

DNA-Standards (NEB, USA):

100bp Leiter: 1517 / 1200 / 1000 / 900 / 800 / 700 / 600 / 500 / 400 / 300 / 200 / 100

1kb Leiter: 10 / 8 / 6 / 5 / 4,5 / 4 / 3 / 2 / 1 kb

## RNA-Standards:

G319A (Promega, Mannheim): 6583 , 4981 , 3638 , 2604 , 1908 , 1383 , 955 , 623 , 281

PhiX174 (Promega, Mannheim): 726 , 713 , 553 , 500 , 427 , 417 , 413 , 311 , 249 , 200 , 151 , 140 , 118 , 100 , 82 , 66 , 48 , 42 , 40 , 24

## Protein-Standards:

Dalton Mark L7 (Sigma chemicals, Steinheim): 66 / 45 / 36 / 29 / 24 / 20,1 / 14,2

Rainbow coloured protein molecular weight marker (Amersham, Freiburg): 45 / 30 / 20,1 / 14,3 / 6,5 / 3,5 / 2,5

## Antikörper:

$\alpha$ -amyloid- $\beta$ -Antikörper (mouse)	Chemicon, Temecula, USA
$\alpha$ -Ras Antikörper, Maus IgG1 Isotyp	BD, Heidelberg
HisProbe ( $\alpha$ -His <sub>6</sub> -tag, aus Kaninchen)	SantaCruz, USA
$\alpha$ -mouse-Meerrettich Peroxidase Konjugat	Amersham Biosciences, Freiburg
$\alpha$ -rabbit-Meerrettich Peroxidase Konjugat	Amersham Biosciences, Freiburg

## Bakterienstämme

<i>E. coli</i> TGI	supE hsd $\Delta$ 5 thi $\Delta$ (lac-proAB) F'[traD 36 proAB <sup>+</sup> LacI <sup>q</sup> lacZ $\Delta$ M15]
<i>E. coli</i> K12 JM 109	e14-(McrA -) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (rk-mk+) supE44 relA1 D(lac-) [F' traD36 proAB lacIqZDM15] (NEB, Maryland, USA)
<i>E. coli</i> BL21	F <sup>-</sup> , ompT, hsdS <sub>B</sub> , (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ), gal, dcm, (Novagene, INC., Madison, Wisconsin)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F <sup>-</sup> , ompT, hsdS <sub>B</sub> , (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ), gal, dcm, (DE3), (Novagene, INC., Madison, Wisconsin)

*E. coli* BL21(DE3) pLysS  $F^{-}$  ompT gal [dcm] [lon] hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup>,m<sub>B</sub><sup>-</sup>) λ(DE3) pLysS(Cm<sup>R</sup>)

*E. coli* Rosetta(DE3)pLysS  $F^{-}$  ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup>,m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm lacY1 (DE3) pLysSRARE<sup>2</sup>  
(Cm<sup>R</sup>), Novagen, Madison (USA)

*E. coli* K38: *hfrC tonA22 garB12 ompF relA1 pit-10 spoT1 T2 phoA6 lys-3 metB10 trpC2*

#### Plasmide:

pAR1219	Amp <sup>R</sup>	Takanori Kigawa, Riken, Japan
pET 14b ras c'	Amp <sup>R</sup>	Doro Kühlmann, MPI Dortmund
pET 14b ras fl	Amp <sup>R</sup>	Doro Kühlmann, MPI Dortmund
pK7 CAT	Kan <sup>R</sup>	Takanori Kigawa, Riken, Japan
pK7 ras171wt	Kan <sup>R</sup>	Takanori Kigawa, Riken, Japan
pET9d TEV S229V	Kan <sup>R</sup>	Gunter Stier, EMBL Heidelberg
pET 14b	Amp <sup>R</sup>	Merck, Darmstadt
pET21a TmCSP	Amp <sup>R</sup>	Konstanze von König
pET11a BsCSP	Amp <sup>R</sup>	Prof. Dr. F.X. Schmid, Bayreuth
pBluescriptII SK BcCSP	Kan <sup>R</sup>	Prof. Dr. F.X. Schmid, Bayreuth

#### Fertigkits:

Qiaprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
Qiafilter Plasmid Midi oder Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAEX II Kit	Qiagen, Hilden
Riboprobe	Promega, Mannheim
QuikChange Site Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla, USA
Coomassie Plus Protein Assay Reagent	Pierce, Illinois, USA
ECL <sup>+</sup> Detection Kit	Amersham, Freiburg
RTS 500	Roche, Mannheim

## 7 Methoden

### 7.1 Molekularbiologische Methoden

#### 7.1.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

##### 7.1.1.1 Agarosegelelektrophorese

Die Separation von DNA-Molekülen kann mit Hilfe ihrer längenabhängigen Wanderungsgeschwindigkeit im Agarosegel durchgeführt werden. Dazu wurden 1 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Nach dem Abkühlen wurden 4 µl Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml) zugesetzt, in die Flachbettgelkammer gegossen und ein Kamm mit geeignet großen Taschen eingesetzt. Nach dem Erstarren wurden die Nukleinsäureproben mit 1/6 ihres Volumens an 6x DNA-Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 30 bis 60 Minuten bei 80-100 V in TAE als Laufpuffer. Nach der Elektrophorese war die DNA im UV-Licht sichtbar.

##### 7.1.1.2 Reinigung von DNA aus Agarosegelen

Nach der Auftrennung von Nukleinsäuren im präparativen Agarosegel wurde die Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten und das Agarosestück mit dem QIAEX II Kit von Qiagen (Hilden) nach Vorschrift des Herstellers aufgereinigt. Die Elution erfolgte mit Wasser.

##### 7.1.1.3 Herstellung kompetenter Zellen

100 ml LB wurde mit 1 ml einer Übernachtskultur des entsprechenden Stammes in LB angeimpft und bis zu einer  $OD_{595nm}$  von 0,3 bis 0,5 bei 37°C und 180 rpm angezogen. Danach wurde die Kultur 20 Minuten auf Eis inkubiert und bei 4000 g und 4°C für 5 Minuten

abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml eiskaltem TSS Puffer resuspendiert, in 200 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Der TSS-Puffer enthält DMSO zur Erhöhung der Permeabilität der Zellmembranen und  $Mg^{2+}$ , um eine Bindung der negativ geladenen DNA an die negativ geladene Zellmembran zu vermitteln.

#### 7.1.1.4 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA wurde durch die Firma GENEART (Regensburg) durchgeführt. Dazu wurden 350 µg DNA in 7 µl verwendet. Als Primer wurden meist die Sequenzen des T7 Promotor oder Terminator eingesetzt. Wenn ein sequenzspezifischer Primer benötigt wurde, wurde 1 µl davon in einer Konzentration von 10 µM zugesetzt.

#### 7.1.1.5 Herstellung von Glycerinkulturen

Um *E. coli*-Kulturen zu konservieren, wurden diese in 15 % sterilem Glycerin bei -80°C eingefroren. Das Glycerin verhindert die Bildung von Eiskristallen und erhöht dadurch die Überlebensfähigkeit der Zellen beim Einfrieren. Dazu wurden 10 ml einer Übernachtskultur bei 4000 g und 4°C für 15 Minuten pelletiert, der Überstand dekantiert und das Pellet mit etwas Restmedium resuspendiert. 700 µl dieser Suspension wurden mit 300 µl sterilem Glycerin (50 % in Wasser) gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

## 7.1.2 Klonierung von DNA

### 7.1.2.1 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ermöglicht es, beliebige dsDNA-Stränge zu vervielfältigen. Das Prinzip beruht auf der Anwendung von thermostabilen DNA-Polymerasen aus z. B. *Thermus Aquaticus* (Taq-Polymerase) oder *Pyrococcus furiosus* (Pfu Polymerase) in Kombination mit der Möglichkeit, DNA-Doppelstränge thermisch aufzuschmelzen. Nach einem initialen Hitzeschritt werden die Einzelstränge mit je einem sequenzspezifischen Primer hybridisiert. Darauf folgt eine Elongationsphase durch die Polymerase. Nachdem die nun entstandenen Doppelstränge wieder thermisch aufgeschmolzen wurden, kann die nächste Hybridisierung und Elongation beginnen. Dieser Zyklus (Aufschmelzen, Annealen, Verlängern) wird ca. 25-40-mal wiederholt, die Steuerung erfolgt über Temperaturänderungen im Thermocycler. Das überwiegend verwendete Programm hat folgendes Schema:

1	1 min 30 sec	95°C	} 30 Wiederholungen
2	30 sec	95°C	
3	1 min	55°C	
4	2 min	72°C	
5	8 min	72°C	
6	Hold	4°C	

Bei Umklonierungsaufgabenstellungen wurden Oligonukleotidprimer verwendet, die neben der Sequenz, die spezifisch für das zu amplifizierende Fragment ist, auch Restriktionsschnittstellen enthalten, damit das PCR Fragment geschnitten und in Vektoren ligiert werden konnte.

## Ansatz:

Primer Sense	100 pmol
Primer Antisense	100 pmol
Template-DNA	100 ng
DNTPs 2 mM	10 µl
10x Puffer	10 µl
Taq-Polymerase	1 µl
H <sub>2</sub> O	ad 100 µl

## 7.1.2.2 Restriktionsverdau von DNA

Um eine gewünschte Nukleinsäuresequenz in *E. coli* vermehren zu können, musste diese in ein bakterielles Plasmid, den Vektor inseriert werden. Dazu wurden vorhandene Restriktionsschnittstellen auf den Vektoren verwendet und das Insert mittels PCR mit denselben Schnittstellen versehen. Sowohl Vektor als auch Insert wurden danach geschnitten:

## Ansatz:

DNA	1 µg
10x Puffer	2 µl
BSA (1 mg/ml)	2 µl
Restriktionsenzym	2U
Wasser	ad 20 µl

Die Restriktionsenzyme und Puffer wurden von NEB (Beverly, USA) bezogen und die Reaktion wie im Handbuch angegeben inkubiert. Vektoren wurden generell 2 Stunden verdaut, Inserts wegen der endständigen Restriktionsschnittstellen 20 Stunden.

## 7.1.2.3 Dephosphorylierung von linearisierten Vektoren

Falls bei einem Vektorverdau komplementäre Enden entstanden, z. B. beim Verdau mit nur einem Restriktionsenzym oder bei glatten Enden („blunt end“), dann mussten die 5' Enden



mit Hilfe alkalischer Phosphatase dephosphoryliert werden, um eine Religation beim darauf folgenden Ligationsschritt zu verhindern. Ausgehend vom Verdauansatz (20 µl) wurde das Restriktionsenzym durch Hitze (5 Minuten 70°C) inaktiviert und anschließend mit 10 µl 10x Puffer, 68 µl Wasser und 2 µl Phosphatase versetzt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach dem Abstoppen der Reaktion (+2 µl EDTA 0,5M, 5 Minuten bei 70°C) wurde das Plasmid über ein Agarosegel aufgereinigt.

#### 7.1.2.4 Ligation

Zwei DNA Fragmente mit kompatiblen Enden wurden mit Hilfe der T4 DNA Ligase miteinander verbunden. Zur Ligation von Vektor und Insert wurden ca. 100 ng des Vektors mit dem 5 fachen molaren Überschuss an Insert gemischt und zusammen mit 1x T4 Ligasepuffer und 5 WEISS U T4 Ligase für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ligationsansatz in *E. coli* TG1 transformiert (siehe 7.1.2.5)

#### 7.1.2.5 Transformation (Hitze Schock Transformation)

1-2 µg Plasmid-DNA wurden zu 200 µl einer Suspension von kompetenten Zellen pipettiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock für 2 Minuten bei 42°C. Anschließend wurde der Ansatz 2 Minuten auf Eis gekühlt. Um die Zellen anwachsen zu lassen, wurden sie nach Zugabe von 1 ml LB<sub>0</sub> 45 Minuten bei 37°C und 300 rpm geschüttelt. Nach Abzentrifugieren der Zellen für 30 Sekunden bei 16060 g in der Tischzentrifuge wurde 1 ml des Überstandes verworfen, das Pellet im Restmedium resuspendiert und auf einer Agarplatte (LB-Agar mit geeignetem Antibiotikum zur Selektion auf das jeweilige Plasmid) ausplattiert. Die Platten wurden mindestens 12 Stunden bei 37°C inkubiert.

### 7.1.2.6 Kolonie-PCR

Diese Version der PCR wurde verwendet, um entscheiden zu können, ob Transformanden das richtige Insert tragen. Dazu wurde eine Kolonie mit einer sterilen Pipettenspitze von der Platte abgenommen und sowohl auf einer Sicherungsplatte ausgestrichen als auch in einen PCR Ansatz (Zusammensetzung siehe 7.1.2.1 ohne Template) mit entsprechenden Primern, aber ohne DNA, getaucht. Danach wurde folgendes Thermocyclerprogramm durchgeführt:

1	5 min	95°C	} 30 Wiederholungen
2	3 min	95°C	
3	3 min	55°C	
4	5 min	72°C	
5	1 min	95°C	
6	1 min 30 sec	55°C	}
7	2 min	72°C	
8	10 min	72°C	
9	Hold	4°C	

### 7.1.2.7 Plasmid-DNA Präparation aus *E. coli*

Wenn kleine Mengen an Plasmid-DNA benötigt wurden (z.B. zur Klonierung oder Sequenzierung), wurde der QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAGEN (Hilden), nach der Anleitung des Herstellers verwendet.

Für die *in-vitro* Translation waren größere Mengen an DNA nötig. Dafür wurden die QIAGEN Plasmid Midi und Maxi Kits, QIAGEN, verwendet. Das angegebene Kulturvolumen wurde jeweils vervierfacht, um eine höhere Ausbeute an Plasmid zu erhalten. Dementsprechend wurden auch Resuspensionspuffer P1, Lysepuffer P2 und Neutralisationspuffer P3 vervierfacht und der Überstand wurde nach der Abzentrifugation der Zelltrümmer nochmals filtriert.

### 7.1.2.8 Ortsspezifische Mutagenese (*site-directed mutagenesis*)

Um kleinere genetische Veränderungen an Plasmiden vorzunehmen (z.B. Insertionen von Proteaseschnittstellen, Punktmutationen in Proteinen oder Deletionen), wurde die Technik der Ortsspezifischen Mutagenese verwendet. Das verwendete Protokoll ist an den QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, USA) angelehnt. Dam-methylierte DNA (isoliert aus einem *E. coli*-Stamm mit dam-Methylase, z.B. TG1 oder JM109) wurde dabei einer Polymerasekettenreaktion über das ganze Plasmid hinweg unterworfen. Die Primer trugen dabei die gewünschte Änderung im Plasmid, flankiert von je ca. 10-12 Basen entsprechend der zu mutierenden Stelle. Die Länge der Oligonukleotide war abhängig von der Schmelztemperatur  $T_m$ . Diese sollte 65°C betragen und wurde nach der 4+2-Regel ( $T_m/^{\circ}\text{C} = 4 \times (\text{G} + \text{C}) + 2 \times (\text{A} + \text{T})$ ) berechnet.

Der Reaktionsansatz bestand aus 20 ng des zu mutierenden Plasmids, 1 µl dNTP-Mix, 1 µl 10x Reaktionspuffer, 1 µl PfuTurbo DNA-Polymerase und einem in sich komplementären Oligonukleotidpaar in 50 µl Gesamtvolumen.

Dieser Ansatz wurde folgendem Thermocyclerprogramm unterzogen:

1	30 sec	95°C	} 12-18 Wiederholungen
2	30 sec	95°C	
3	1 min	55°C	
4	2,6 min / kB	72°C	
6	hold	4°C	

Das Prinzip beruht darauf, dass das aufgeschmolzene Originalplasmid exponentiell vervielfältigt wird, jedoch mit der gewünschten Mutation. Es entstehen in jedem Zyklus Tochterstränge, die nicht dam-methyliert sind. Abschließend wurden die dam-methylierten Elternstränge durch Verdau mit dem Restriktionsenzym Dpn I entfernt. Dazu wurde 1 µl Dpn I (Stratagene, USA) zugesetzt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. 20 µl des Ansatzes wurden in TG1 Zellen transformiert.

### 7.1.3 RNA Synthese und Aufreinigung

Die *in-vitro* Transkription wurde mit dem Kit „Riboprobe“ (Promega, Mannheim) nach Vorgabe des Herstellers durchgeführt. Es wurde dabei entweder RNA für weitere Versuche präpariert (100 µl Ansatz) oder die Transkription in Abhängigkeit von der Anwesenheit von Kälteschockproteinen analysiert. Dabei war das Reaktionsvolumen 20 µl, wobei 3 µl des Volumens entweder NaP-Puffer mit oder ohne *TmCSP* oder 50 mM Tris-HCl pH 7.8, 100 mM KCl mit oder ohne *BsCSP* bzw. *BcCSP* waren.

Nach RNA Synthese und Abverdau des Plasmids durch RQ1 (Promega, Mannheim), eine RNase freie DNase, wurde die RNA nach der Transkription über eine Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt. Dazu wurde der Ansatz mit RNase freiem Wasser auf 100 µl aufgefüllt und mit 100 µl Rotiphenol gemischt. Dabei fielen die Proteine an der Phasengrenzschicht aus. Nach Zentrifugation für 3 Minuten bei 16000 g wurde die hydrophobe Phase abgenommen und die hydrophile Phase mit 200 µl Chloroform gemischt. Nach erneuter Zentrifugation konnte mit dem Chloroform der Rest an Phenol mit abgenommen werden. Die wässrige Phase wurde danach mit 75 µl 5 M Ammoniumacetat versetzt und die Nukleinsäurepräzipitation durch Zugabe von 250 µl absolutem Ethanol eingeleitet. Damit die RNA quantitativ ausfallen konnte, wurde der Ansatz über Nacht bei -80°C gelagert. Der Ansatz wurde danach 20 Minuten bei 15000 g und 4°C abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet nochmals mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren (20 Minuten, 15000 g, 4°C) wurde der Überstand wiederum verworfen, das Pellet getrocknet und in 25 µl nukleasefreiem Wasser aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Messung der Absorption bei 260 nm. Die Zusammensetzung der RNA-Präparation wurde durch Agarosegelelektrophorese, Polyacrylamid-Gelelektrophorese oder AGILENT analysiert.

## 7.2 Proteinbiochemische Methoden

### 7.2.1 Methoden zur zellfreien Proteinsynthese

#### 7.2.1.1 Herstellung eines *E. coli* S30 Extraktes

Der S30 Extrakt, das Zelllysate, ist die Grundlage jedes Systems zur zellfreien Proteinsynthese. Es enthält alle hochmolekularen Komponenten, die für eine erfolgreiche Translation essentiell sind. Dazu gehören neben den Ribosomen die Aminoacyl-tRNA Synthetasen und die Translationsfaktoren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich Zelllysate aus *E. coli* verwendet, da mit diesen Extrakten die höchsten Syntheseraten im kombinierten Transkriptions/Translationssystem erreicht werden können. Die Proteine, die zur Expression benötigt werden, sind im Lysat dann am höchsten angereichert, wenn die Zellen zum Zeitpunkt des stärksten Wachstums geerntet werden, also in der halblogarithmischen Phase. Dort sind die am Syntheseapparat beteiligten Proteine *in-vivo* hochinduziert und degradierende Enzyme wie Nukleasen und Proteasen wenig prominent.

Die Herstellung eines S30 Lysats (bei 30000 g) wurde nach der Methode von Pratt (1984) durchgeführt, welche leicht modifiziert wurde. Zur Herstellung wurde der *E. coli* Stamm BL21 verwendet, da dieser sich wegen seiner Proteasedefizienz zur Proteinexpression besonders gut eignet.

Sämtliche Arbeitsmaterialien und Lösungen wurden dabei RNase-frei eingesetzt.

400 ml 2x TY wurden von einer Glycerinkultur des *E. coli* Stammes BL21 beimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Mit dieser Vorkultur wurden 10 l 2x TY angeimpft und bis zu einer OD<sub>595nm</sub> von 1 angezüchtet. Die Kultur wurde dann sofort auf Eis gekühlt und die Zellen durch Zentrifugation geerntet (2500 g, 30 Minuten, 4°C).

Das Zellpellet wurde in 1 l S30-Puffer mit  $\beta$ -Mercaptoethanol resuspendiert und abzentrifugiert (4000 g, 5 Minuten, 4°C). Dieser Waschschrift wurde dreimal durchgeführt. Beim letzten Zentrifugationsschritt wurde für 10 Minuten bei 10000 g zentrifugiert und das Pellet danach bei -80°C gelagert.

Das Pellet wurde in 1 l S30-Puffer mit  $\beta$ -Mercaptoethanol resuspendiert und erneut abzentrifugiert (16000 g, 30 Minuten, 4°C). Die Zellmasse wurde gewogen und pro Gramm Zellen wurden 1,2 ml S30-Puffer ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol zugesetzt und die Zellmasse unter

ständiger Eiskühlung schonend homogenisiert. Das Homogenisat wurde mit S30-Puffer ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol um den Faktor 4 verdünnt und auf Falcon-Tubes verteilt. Danach erfolgte der Zellaufschluss mit dem Ultraschallgerät bei Stufe 3. Es erfolgten jeweils 4 Durchgänge von je 15 Sekunden, dazwischen wurde 1 Minute auf Eis gekühlt. Die Zellfragmente wurden durch Zentrifugation entfernt. Bei der Herstellung eines S30 Lysats wurde dieses für 30 min bei 30000 g zentrifugiert, danach der Überstand abgenommen und nochmals zentrifugiert. Nach den Zentrifugationsschritten wurde das Rohlysats mit dem 0,3 fachen Volumen an Präinkubationspuffer versetzt.

Anschließend wurde das Lysat ohne Präinkubationsperiode direkt dialysiert. Dabei wurden störende niedermolekulare Substanzen entfernt. Die Dialyseschläuche (MWCO 15000 Da, RNase frei) wurden dazu durch Auskochen vorbereitet. Sie wurden zuerst in 0,1 M  $\text{NaHCO}_3$ , 10 mM EDTA (RNase frei), dann in S30-Puffer ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol aufgeköcht. Die Dialyse erfolgte für 4x 45 Minuten gegen das 50 fache Lysatvolumen an S30 Puffer ohne Mercaptoethanol.

Das Dialysat wurde abschließend bei 4000 g für 10 Minuten zentrifugiert, in 800  $\mu\text{l}$  Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

#### 7.2.1.2 Expression und Aufreinigung von T7 RNA-Polymerase

Die Expression der T7 RNA Polymerase erfolgte ausgehend vom Plasmid pAR1219 basierend auf der Anleitung von Zawadzki und Gross (1991) im *E. coli* Stamm B121.

3,2 l  $\text{M9TB}_{\text{Carb}}$ -Medium wurden mit 10 ml einer über-Nacht-Kultur beimpft und bei  $37^\circ\text{C}$  bis zu einer  $\text{OD}_{595\text{nm}}$  von 0,5 angezogen. Die Expression wurde durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert und erfolgte für 3 Stunden. Nach der Zellernte durch Zentrifugation (2500 g, 15 Minuten,  $4^\circ\text{C}$ ) wurde das Pellet mit je 100 ml Waschpuffer (20 mM Tris/HCl, pH 8,1, 20 mM NaCl, 2 mM EDTA) resuspendiert und wieder pelletiert (10000 g, 10 Minuten,  $4^\circ\text{C}$ ). Die Lagerung der Zellmasse erfolgte bei  $-80^\circ\text{C}$ .

Das Pellet wurde nach dem Auftauen in 24 ml LB-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,1, 20 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM DTT) resuspendiert. Nach Zugabe von 6 ml Lysozymlösung (1,5 mg/ml in LB-Puffer), 57  $\mu\text{l}$  0,1 M PMSF (20 mg/ml in Isopropanol) und 420  $\mu\text{l}$  25x Protease-Inhibitor wurde für 30 Minuten auf Eis gerührt. Der Zellaufschluss wurde durch Zugabe von 2,5 ml 0,8% (w/v) Natrium-Desoxycholat eingeleitet und durch 30 Minuten Rühren vervollständigt. Anschließend erfolgte die Polymin-Präzipitation. Dazu wurden 5 ml 2 M

(NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>-Lösung in LB-Puffer zugegeben und mit LB-Puffer auf 50 ml aufgefüllt. Zu dieser Lösung wurden 5 ml 10% Polymyxin-HCl, pH 8 getropft und für 20 Minuten bei 4°C gerührt. Der Niederschlag wurde durch Zentrifugation (39000 g, 15 Minuten, 4°C) abgetrennt.

Die Polymerase verblieb bei diesem Schritt im Überstand. Die darin enthaltenen Proteine wurden durch Ammoniumsulfatfällung aufkonzentriert. Dazu wurde das 0,28 fache Volumen an gesättigter (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>-Lösung zugegeben, 15 Minuten bei 4°C gerührt und die ausgefallenen Proteine abzentrifugiert (12000 g, 10 Minuten, 4°C). Das Pellet wurde in 15 ml Puffer C (20 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,7 mit Orthophosphorsäure, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5% Glycerin) mit 100 mM NaCl resuspendiert und das Ammoniumsulfat durch Dialyse (MWCO 15000 kDa) gegen 1 l Puffer C / 100 mM NaCl entfernt. Nach Zentrifugation (12000 g, 10 Minuten, 4°C) wurde der Überstand (ca. 20 ml) mit dem gleichen Volumen an Puffer C ohne NaCl versetzt.

Die weitere Aufreinigung erfolgte durch Kationenaustauschchromatographie an SP Sepharose (Amersham, Freiburg). Die Säule wurde in Puffer C / 50 mM NaCl äquilibriert, das Protein aufgetragen und die Säule mit 3 Säulenvolumina Auftragspuffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit Puffer C / 200 mM NaCl. Die Fraktionen mit der höchsten Konzentration an T7 - RNA-Polymerase (bestimmt durch SDS-PAGE) wurden vereinigt und durch Ultrafiltration (Vivaspin 20 10000 MWCO, 4000 g, 10 Minuten, 4°C) auf die Hälfte des Volumens aufkonzentriert. Der Überstand wurde durch 2x 24 Stunden Dialyse gegen Puffer C / 10 mM NaCl entsalzt, wobei die T7-RNA-Polymerase ausfiel. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert (10000 g, 10 Minuten, 4°C) und in 10 ml Puffer C / 100 mM NaCl resuspendiert. Die Lösung wurde so lange gegen Puffer C / 100 mM NaCl / 50% Glycerin dialysiert, bis sich das Volumen auf 3 ml reduziert hatte. Das Dialysat enthielt reine T7-RNA-Polymerase und wurde bei -20°C gelagert.

#### 7.2.1.3 *In-vitro* Proteinexpression im Batchverfahren

Die Zellfreiexpression im Batchverfahren ist gekennzeichnet durch eine sehr hohe Expressionsgeschwindigkeit, wenn auch bei limitierter Reaktionsdauer. Typischerweise kommt die Reaktion nach ca. einer Stunde zum Erliegen, da dann erste Substrate verbraucht sind und sich zunehmend Abbauprodukte störend auf den Prozess auswirken. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Batchansatz zu verschiedenen Zwecken eingesetzt. Zum einen, um mit Hilfe der Expression von Standardproteinen wie Chloramphenicolacetyltransferase im 30

µl Maßstab die Tauglichkeit neu hergestellter Komponenten zu testen. Weiterhin, um zu testen, wie gut ein bestimmtes Protein im zellfreien System löslich oder unlöslich exprimiert werden kann. Dazu wurde ein Ansatz von 100 µl nach der Expression acetongefällt (7.2.3.3) und die Expressionsrate durch Westernblot Analytik bestimmt.

Bei Proteinen, die nach gewisser Expressionszeit zur Aggregation oder Degeneration tendieren, wurde die Präparation ausgehend von großvolumigen Batchansätzen durchgeführt. Die Ansatzgröße betrug meist 10 bis 20 ml.

Es wurden dazu in Eppendorfgefäßen folgende Komponenten vorgelegt:

3',5'-cyclo AMP	0,65 mM
Aminosäuren	je 1 mM
Ammoniumacetat	27,64 mM
ATP	1,22 mM
Creatinkinase	0,25 mg/ml
Creatinphosphat	80,85 mM
CTP, GTP, und UTP	je 0,87 mM
DTT	1,77 mM
<i>E. coli</i> S-30 Extrakt (7.2.1.1)	36 % (v/v)
<i>E. coli</i> tRNA (MRE 600)	0,168 mg/ml
HEPES-KOH (pH 7.5)	57,96 mM
Kaliumglutamat	201,98 mM
L(-)-5-formyl-5,6,7,8-Tetrahydrofolat	0,068 mg/ml
Magnesiumacetat	4 mM
PEG 8000	4,028 % (w/v)
Protease-Inhibitor	1 x
T7 RNA Polymerase (7.2.1.2.)	0,045 mg/ml

Creatinphosphat wurde frisch in DEPC-H<sub>2</sub>O aufgelöst, Creatinkinase wurde frisch in 10 mM HEPES-KOH, pH 7,5, gelöst. Die Inkubation erfolgte gemeinsam mit dem jeweiligen Plasmid in einer Konzentration von 33 µg/ml bei 37°C und 500 rpm im Thermomixer compact für 1 Stunde.

Diese Methode ist auch dazu geeignet, den Einfluss bestimmter Komponenten, z.B. von Kälteschockproteinen, auf die *in-vitro* Expression zu bestimmen.



Es wurden dazu in einem Eppendorf-Tube folgende Komponenten in einem Endvolumen von 30  $\mu\text{l}$  vorgelegt, wobei davon 4  $\mu\text{l}$  Wasser oder eine Lösung von Kälteschockproteinen und/oder Nukleotiden waren:

3',5'-cyclo AMP	0,65 mM
Aminosäuren außer Tyrosin	je 0,3 mM
Ammoniumacetat	27,64 mM
ATP	1,22 mM
Creatinkinase	0,25 mg/ml
Creatinphosphat	80,85 mM
CTP, GTP, und UTP	je 0,87 mM
DTT	1,77 mM
<i>E. coli</i> S30 Extrakt (siehe 7.2.1.1)	35,1 % (v/v)
<i>E. coli</i> tRNA (MRE 600)	0,168 mg/ml
HEPES-KOH (pH 7.5)	57,96 mM
Kaliumglutamat	201,98 mM
L(-)-5-formyl-5,6,7,8-Tetrahydrofolat	68 $\mu\text{g/ml}$
Magnesiumacetat	4 mM
PEG 8000	4,028 % (w/v)
Plasmid-DNA	33 $\mu\text{g/ml}$
Protease-Inhibitor	1 x
RNase-Inhibitor	0,016 U/ $\mu\text{l}$
T7 RNA Polymerase (siehe 7.2.1.2.)	0,045 mg/ml

Die Ansätze wurden mit verschiedenen Konzentrationen von verschiedenen Kälteschockproteinen in Mikrotiterplatten vorgelegt und bei 37°C im Thermomixer comfort bei 500 rpm für 60 Minuten inkubiert.

#### 7.2.1.4 *In vitro* Translation von gereinigter mRNA

Mit den aus 7.2.1.3 bekannten Komponenten ist es auch möglich, eine *in-vitro* Translation durchzuführen, wobei anstelle von Plasmid und T7 RNA-Polymerase die aufgereinigte mRNA (7.1.3) eingesetzt wird. Dies ermöglicht es, den Einfluss von Kälteschockproteinen auf die isolierte Translationsreaktion zu beobachten. Folgende Komponenten wurden in ein Eppendorfgesäß mit einem Gesamtvolumen von 26  $\mu\text{l}$  gegeben:

3',5'-cyclo AMP	0,65 mM
Aminosäuren außer Tyrosin	je 0,3 mM
Ammoniumacetat	27,64 mM
ATP	1,22 mM
Creatinkinase	0,25 mg/ml
Creatinphosphat	80,85 mM
CTP, GTP, und UTP	je 0,87 mM
DTT	1,77 mM
<i>E. coli</i> S30 Extrakt (siehe 7.2.1.1)	34 % (v/v)
<i>E. coli</i> tRNA (MRE 600)	0,168 mg/ml
HEPES-KOH (pH 7.5)	57,96 mM
Kaliumglutamat	201,98 mM
L(-)-5-formyl-5,6,7,8-Tetrahydrofolat	68 µg/ml
Magnesiumacetat	4 mM
PEG 8000	4,028 % (w/v)
mRNA codierend für CAT	100 µg/ml
RNase-Inhibitor	0,016 U/µl

Der Ansatz wurde mit Lösungen an Kälteschockproteinen oder Ausgleichspuffer auf 30 µl aufgefüllt und für 1 Stunde bei 37°C und 500 rpm im Thermomixer compact inkubiert. Anschließend wurde das Expressionsniveau durch CAT-Assay (7.2.1.6) und Westernblot (7.2.3.7) analysiert.

#### 7.2.1.5 Präparativer *in-vitro* Expressionsansatz im DispoDialyzer

Um bei einem zellfreien Expressionsansatz die Konzentration des Zielproteins über das Niveau des Batchansatz hinaus zu erhöhen, muss die Expressionsdauer verlängert werden. Eine Verlängerung ist nur möglich, wenn es gelingt, verbrauchte Substrate wie Energievorläufer oder Bausteine wie Nukleotide oder Aminosäuren nachzuführen, und dabei gleichzeitig inhibitorische Nebenprodukte ausverdünnt werden. Dazu sind, wie in 1.2 dargelegt, verschiedene Systeme entwickelt worden. Aufgrund der hohen Ausbeute und des verhältnismäßig geringen apparativen Aufwands wurde im Rahmen dieser Arbeit die Technik des „Continuous Exchange Cell Free“ (CEFC) verwendet. Hierbei steht die Reaktionslösung mit einer Nährstofflösung über eine Dialysemembran in Kontakt. Es wurde ein DispoDialyzer (Spectra/Por, USA) MWCO 50000 verwendet, wo 1 ml der Reaktionslösung mit 10 ml einer Nährstofflösung in einem 15 ml Falcon Tube in Kontakt standen.

Dieses System wurde bei 37°C und 220 rpm im Inkubator Multitron für 20 Stunden geschüttelt. Nach 10 Stunden wurde die Nährstofflösung ersetzt und Plasmid, T7 RNA Polymerase und Creatinkinase supplementiert.

Die Zusammensetzung der Reaktionslösung:

3',5'-cyclo AMP	0,65 mM
Aminosäuren	je 1 mM
Ammoniumacetat	27,64 mM
ATP	1,22 mM
Creatinkinase	0,25 mg/ml
Creatinphosphat	80,85 mM
CTP, GTP, und UTP	je 0,87 mM
DTT	1,77 mM
<i>E. coli</i> S30 Extrakt (7.2.1.1)	36 %(v/v)
<i>E. coli</i> tRNA (MRE 600)	0,168 mg/ml
HEPES-KOH (pH 7.5)	57,96 mM
Kaliumglutamat	201,98 mM
L(-)-5-formyl-5,6,7,8-Tetrahydrofolat	0,068 mg/ml
Magnesiumacetat	4 mM
PEG 8000	4,028 % (w/v)
Protease-Inhibitor	1 x
RNase Inhibitor	1,27 %(v/v)
T7 RNA Polymerase (7.2.1.2.)	0,045 mg/ml

Die Zusammensetzung der Nährstofflösung :

3',5'-cyclo AMP	0,65 mM
Aminosäuren	je 1 mM
Ammoniumacetat	27,64 mM
ATP	1,22 mM
Creatinphosphat	80,85 mM
CTP, GTP, und UTP	je 0,87 mM
DTT	1,77 mM
<i>E. coli</i> tRNA (MRE 600)	0,168 mg/ml
HEPES-KOH (pH 7.5)	57,96 mM
Kaliumglutamat	201,98 mM
L(-)-5-formyl-5,6,7,8-Tetrahydrofolat	0,068 mg/ml
Magnesiumacetat	4 mM
PEG 8000	4,028 % (w/v)
Protease-Inhibitor	1 x

### 7.2.1.6 Nachweis der Chloramphenicol-Acetyltransferase

Die Expression von Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) wurde dazu benutzt, um neu hergestellte Komponenten auf ihre Tauglichkeit hin zu testen. Weiterhin wurde dieses Protein als Reportergen bei der Analytik von RNA Chaperonen verwendet.

CAT kann direkt im Ansatz nachgewiesen werden. Dazu wird ein gekoppelter Enzymtest verwendet. Bei diesem setzt die Chloramphenicol-Acetyltransferase Acetyl-Coenzym A zu Coenzym A mit freier SH-Gruppe um. Diese Sulfhydrylgruppe kann das Substrat 5,5'-Dithiobis-2-Nitrobenzoesäure (DTNB) zu 5-Thio-2-Nitrobenzoat umsetzen. Das Produkt hat sein Absorptionsmaximum bei 412 nm, was eine spektrophotometrische Analytik der Umsatzrate erlaubt (Shaw, 1975).

Versuchsdurchführung:

Der *in-vitro* Expressionsansatz wurde in 100 mM Tris/HCl pH 7,8 verdünnt und ein Aliquot davon zu einem Aliquot CAT-Testlösung gegeben und bei 37°C für 30 Minuten bei 300 rpm im Thermomixer compact inkubiert. Die Reaktion wurde durch Eiskühlung gestoppt und die  $A_{412\text{nm}}$  bestimmt.

Konzentrationsberechnung:

$$c(\text{CAT}) = \frac{\Delta A(412 \text{ nm}) \cdot v}{\epsilon \cdot d \cdot t \cdot E}$$

$\Delta A(412 \text{ nm})$	Absorptionänderung bei 412 nm	
$v$	Verdünnungsfaktor	
$\epsilon$	Extinktionskoeffizient (5-Thio-2-Nitrobenzoat)	13600 l/(mol·cm)
$d$	Dicke der Küvette	1 cm
$t$	Inkubationszeit	30 Minuten
$E$	Enzymaktivität der CAT pro mg	150 U/mg

## 7.2.2 Heterologe Expression von Proteinen in *E. coli*

### 7.2.2.1 Expression und Aufreinigung von *TmCSP*

Das Plasmid codierend für *TmCSP*, dem Kälteschockprotein aus *Thermotoga maritima*, wurde frisch in *E. coli* Rosetta [DE3] pLysS transformiert. Die Zellanzucht erfolgte in 1 Liter LB Medium mit 50 µg/ml Carbenicillin und 68 µg/ml Chloramphenicol bis zu einer OD<sub>595nm</sub> von 1. Danach wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und für 3 Stunden bei 37°C durchgeführt. Nach Zellernte durch Zentrifugation (2500 g, 30 Minuten, 4°C) erfolgte der Zellaufschluss. Die Zellen wurden in 25 ml TEC-Puffer resuspendiert und zweimal mittels French Press bei 18000 psi Druck aufgeschlossen. Anschließend wurden je 20 µg/ml DNaseI, RNaseA und MgCl<sub>2</sub> zugegeben und die Suspension eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 40000 g, 4°C und für 30 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde um den Faktor 5 verdünnt und die meisten *E. coli*-Proteine durch einen Hitzeschritt bei 80°C und 30 Minuten ausgefällt. Nach Zentrifugation (12500 g, 4°C, 60 Minuten) wurde der Überstand auf 70% Ammoniumsulfat gebracht (entspricht 41 g/ 100 ml) und über Nacht bei 4°C gerührt. Ausgefallenes Protein wurde abzentrifugiert (12500 g, 4°C, 60 Minuten) und der Überstand auf pH 8 gebracht. Nach Entgasen wurde das Protein auf eine Phenylsepharosesäule, äquilibriert in TEC pH 8 mit 70% Ammoniumsulfat, aufgetragen und mit einem absteigenden Ammoniumsulfatgradienten eluiert. *TmCSP* eluiert dabei als Doppelpeak, wobei der erste stark mit Nukleinsäuren verunreinigt war und verworfen wurde. Die Fraktionen des zweiten Peaks wurden vereinigt und durch Ultrafiltration auf 1 ml aufkonzentriert. Das Protein wurde entfaltet, indem es auf pH 3 und 4 M Harnstoff gebracht wurde. Während einer Gelfiltration über eine Superdex 75 16 / 60 Säule (Amersham, Freiburg) in Puffer A wurde *TmCSP* von den restlichen Nukleinsäuren abgetrennt und rückgefaltet. Das reine Protein wurde auf eine Konzentration von 3,3 mM aufkonzentriert. Die Konzentrationsbestimmung fand mit dem molaren Extinktionskoeffizienten von 12660 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> statt.

### 7.2.2.2 Expression und Aufreinigung von BsCSP B

Die Expression des Kälteschockproteins aus *Bacillus subtilis* (BsCSP B) wurde in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS durchgeführt, basierend auf dem T7 RNA Polymerase Promotor System. Die Zellen mit dem Plasmid wurden in 5l dYTG-Medium mit 25 µg/ml Chloramphenicol und 300 µg/ml Carbenicillin bei 37°C bis zu einer OD<sub>595nm</sub> von 0,8 angezogen. Die Expression wurde durch Zugabe von 2 mM IPTG induziert. Nach 4 Stunden Expression wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (2500 g, 30 Minuten, 4°C). Das Pellet wurde bei -80°C eingefroren. Das Zellpellet wurde danach in 40 ml CSP-Aufschlusspuffer resuspendiert, zusätzlich 200 µl 20 mg/ml Lysozym zugegeben und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Der Zellaufschluss fand mittels Ultraschall für 2 x 2 Minuten statt. Das Zelllysate wurde durch Zentrifugation (35000 g, 4°C, 30 Minuten) von Zelltrümmern befreit. Der Überstand wurde mit dem doppeltem Volumen an 50 mM Tris-HCl pH 7,8 versetzt und auf eine DEAE-Säule (DEAE Sepharose FF, 65 ml, Amersham, Freiburg), äquilibriert in 50 mM Tris-HCl pH 7,8, geladen. Nach dem Nachwaschen wurden die Proteine mit einem linearen NaCl Gradienten von 0 mM bis 600 mM (Gradientenlänge 450 ml) eluiert. Proteinhaltige Fraktionen wurden per SDS-PAGE auf BsCSP hin analysiert. Das Protein eluierte bei ca. 100 mM. Die fraglichen Fraktionen wurden vereinigt und auf 50% Ammoniumsulfat gebracht (306 g/l). Anschließend wurde die Lösung auf eine Butylsepharosesäule (Butylsepharose FF, 60 ml, Amersham, Freiburg), äquilibriert in 50 mM Tris-HCl pH 7,6, mit 50% Ammoniumsulfat aufgetragen und mit dem gleichen Puffer nachgewaschen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Ammoniumsulfatgradienten von 50% bis 0% innerhalb von 60 ml. Es wurden Fraktionen von 1 ml Volumen gesammelt und von diesen das Verhältnis von A<sub>280</sub>/A<sub>260</sub> bestimmt. Fraktionen mit einem Quotienten größer als 1 (also weitgehend nukleotidfrei) wurden vereinigt und auf ca. 3 ml aufkonzentriert. Zuletzt wurde das Protein noch durch Gelfiltration über eine HiLoad Superdex 75 26/60 prep grade Säule (Amersham, Freiburg) aufgereinigt. Als Laufpuffer diente Puffer B. Wiederum wurden hier die Fraktionen auf ihre Nukleotidfreiheit durch Bildung des A<sub>280</sub>/A<sub>260</sub> Quotienten hin untersucht. Die reinen Fraktionen wurden vereinigt und bis zu einer Konzentration von 5,9 mM aufkonzentriert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten von 5800 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>.

### 7.2.2.3 Expression und Aufreinigung von BcCSP

Das Kälteschockprotein aus *Bacillus caldolyticus* (BsCSP) wurde überexprimiert in *E. coli* K38 pGP1-2 mit dem Plasmid pBluescriptII SK, welches die codierende Sequenz für das Protein enthielt. Die Zellen wurden in 5l dYTG-Medium mit 25 µg/ml Kanamycin und 300 µg/ml Carbenicillin bei 30°C bis zu einer OD<sub>595nm</sub> von 0,8 angezogen, die Expression durch Temperaturänderung auf 42°C induziert und für 4 Stunden durchgeführt. Nach Zellernte (2500 g, 30 Minuten, 4°C) wurde das Zellpellet bei -80°C eingefroren. Vor dem Zellaufschluss wurde das Pellet in 40 ml CSP-Aufschlusspuffer resuspendiert und nach Zugabe von 200 µl 20mg/ml Lysozym für 10 min auf Eis inkubiert. Der Zellaufschluss selbst wurde durch 2 x 2 Minuten Ultraschallbehandlung durchgeführt. Nach dem Abzentrifugieren der Zelltrümmer (35000 g, 4°C, 30 Minuten) wurde das Rohlysate für 40 Minuten auf 65°C erhitzt und erneut abzentrifugiert. Die restliche Aufreinigung erfolgte analog zu der von BsCSP. Der molare Extinktionskoeffizient betrug 7300 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>. Das Protein wurde bis auf 3,0 mM aufkonzentriert.

### 7.2.2.4 Expression und Aufreinigung der TEV-Protease

Um die Protease des „Tobacco Etch Virus“ (im Folgenden TEV-Protease genannt) im großen Umfang verfügbar zu machen, wurde dieses Protein in *E. coli* nach einer Anleitung von Gunther Stier (EMBL, Heidelberg) überexprimiert und isoliert. Dazu wurde das Plasmid pET9d TEV S229V in BL21[DE3] pLysS transformiert. Ein positiver Transformant wurde über Nacht in 5 ml LB Medium mit 68 µg/ml Chloramphenicol, 25 µg/ml Kanamycin und mit 1% Glucose angezüchtet, diese Vorkultur in einen Liter LB-Medium mit 68 µg/ml Chloramphenicol und 25 µg/ml Kanamycin überführt und bei 37°C und 220 rpm angezüchtet. Nach dem Erreichen einer sichtbaren Trübung in der Kultur wurde diese auf 25°C abgekühlt und bis zu einer OD<sub>595nm</sub> von 0,8 weiter anwachsen gelassen. Die Induktion der Expression der TEV-Protease erfolgte mit 0,5 mM IPTG. Nach einer Expressionsdauer von vier Stunden wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 4000 g, 4°C und 30 Minuten abgeerntet. Das Zellpellet wurde zu einer Endkonzentration von 10 ml/g in TEV-Lysepuffer resuspendiert. Der Zellaufschluss wurde durch Zugabe von je einem Hundertstel Volumenteil an Lysozymlösung (10mg/ml) und DNase I Lösung (100 µg/ml) eingeleitet und durch zwei Minuten Ultraschallbehandlung abgeschlossen. Unlösliche Bestandteile wurden durch

Zentrifugation bei 17000 g und 4°C für 20 Minuten sedimentiert und die löslichen Proteine im Überstand auf eine NiNTA-Superflow-Säule (5 ml, äquilibriert in TEV-Lysepuffer) aufgetragen. Der Durchfluss wurde noch zweimal auf die Säule aufgetragen, um eine quantitative Bindung der TEV-Protease an das Säulenmaterial zu erreichen. Nachdem die ungebundenen Proteine ausgewaschen waren, wurden Verunreinigungen mit jeweils 50 ml an TEV-Waschpuffer 1, 2 und 3 ausgewaschen. Die Elution schließlich erfolgte mit 25 ml Elutionspuffer. Während der Elution wurden Fraktionen von 1 ml gesammelt. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden über eine PD10 Säule auf den TEV-Aufbewahrungspuffer umgepuffert. Das Protein wurde auf eine Konzentration von höchstens 1mg/ml verdünnt und auf 50% Glycerin eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

#### 7.2.2.5 Expression und Aufreinigung von amyloid- $\beta$ Fusionsproteinen

Die zelluläre Expression von Fusionsproteinen aus CAT oder GST und A $\beta$ -Peptiden erfolgte im *E. coli*-Stamm Rosetta (DE3) pLysS. Die Plasmide pET14b CAT A $\beta_{40\text{wt}}$  und pET14b GST A $\beta_{40\text{wt}}$  wurden dazu in kompetente Zellen dieses Stamms transformiert. Die Induktion der Expression erfolgte bei einer OD<sub>595nm</sub> von 1 mit 0,4 mM IPTG. Die Expressionsdauer betrug vier Stunden bei 30°C. Nach der Zellernte (4°C, 4000 g, 20 Minuten) wurde das Bakterienpellet bei -20°C gelagert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Lösen des Pellets mit Harnstoffpuffer pH 8. Nach einer Stunde Rühren bei Raumtemperatur wurden unlösliche Bestandteile abzentrifugiert (30000 g, 20°C, 30 Minuten). Der Überstand wurde zusätzlich durch einen Steritop-Flaschenfilter (Millipore, Schwalbach) filtriert und danach auf eine 5 ml große NiNTA-Superflow-Säule (Qiagen, Hilden) geladen. Die Chromatographie wurde mit einer ÄKTA-FPLC (Amersham, Freiburg) bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach dem Probenauftrag wurde so lange mit Harnstoffpuffer pH8 nachgewaschen, bis die UV-Absorption bei 280 nm wieder den Ausgangswert erreicht hatte. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch Waschen der Säule mit Harnstoffpuffer pH 5,9 entfernt. Die Elution des Fusionsproteins erfolgte schließlich mit Harnstoffpuffer mit einem pH von 4,5. Die Fraktionen, die das Zielprotein enthielten, wurden vereinigt und mit 8 M NaOH auf pH 8 gebracht. Diese Lösung wurde zweimal zwei Stunden gegen 50 mM Tris / HCl pH 7,8 bei 4°C dialysiert, sodass das rückgefaltete Fusionsprotein im Überstand vorlag.



### 7.2.3 Allgemeine biochemische Techniken

#### 7.2.3.1 Aufreinigung von zellfrei exprimiertem Protein

Zellfrei hergestellte Proteine wurden angelehnt an das *EasyXpress Protein Synthesis Handbook* von Qiagen (Hilden) aufgereinigt. Der Zellfrei-Ansatz wurde nach der Expression abzentrifugiert (4°C, 16000 g, 10 Minuten) und danach mit dem doppeltem Volumen an Laufpuffer (50 mM Natriumphosphat (pH 8), 300 mM NaCl, 0 mM Imidazol) verdünnt. Diese Lösung wurde auf eine in Laufpuffer äquilibrierte NiNTA Superflow-Säule (5 ml) aufgetragen. Unspezifisch gebundene Proteine wurden mit Waschpuffer (Laufpuffer + 20 mM Imidazol) entfernt. Die Elution erfolgte mit Laufpuffer, der 250 mM Imidazol enthält. Die Chromatographie wurde an einer ÄKTA FPLC (Amersham, Freiburg) durchgeführt.

#### 7.2.3.2 TCA-Fällung

Bei der TCA-Fällung werden Proteine durch Absenkung des pH Wertes präzipitiert. Diese Methode wurde als Vorbereitung auf eine SDS-PAGE (7.2.3.4) angewandt, wenn sich störende Substanzen wie Guanidiniumhydrochlorid im Ansatz befanden. Die Lösung wurde mit einem Viertel des Volumens mit 3 M TCA versetzt und zur vollständigen Präzipitation für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (5 Minuten, 16060 g) wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet dreimal gewaschen (einmal mit 200 µl H<sub>2</sub>O und danach zweimal mit je 100 µl Ethanol) und erneut abzentrifugiert. Nach dem Trocknen des Pellets bei 60°C wurden die Proteine in 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen, mit gasförmigem NH<sub>3</sub> neutralisiert (erkennbar am Indikator Bromphenolblau, der wieder blau wird) und bei 95°C aufgeköcht.

#### 7.2.3.3 Acetonfällung

Diese Methode wurde zur Vorbereitung auf eine SDS-PAGE von zellfreien Expressionsansätzen verwendet sowie zum Aufkonzentrieren von sehr verdünnten Proteinlösungen, z.B. von Fraktionen nach Säulenläufen.

Dazu wurden 200 µl der Probe (geringere Volumina wurden mit Wasser auf 200 µl aufgefüllt) mit 600 µl Aceton gemischt und für mindestens 30 Minuten bei -20°C inkubiert. Danach wurden die ausgefallenen Proteine für 5 Minuten bei 16000 g bei 4°C pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet bei 60°C getrocknet. Das trockene Pellet wurde in 60 µl 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen und vor der Elektrophorese für 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht.

#### 7.2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970)

Zur Analyse von Proteinen größer als 15 kDa wurden diese mittels eindimensionaler SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit dem Puffersystem nach Laemmli (1970) voneinander getrennt. Die Proteine wurden durch Aufkochen für 5 Minuten bei 95°C mit SDS-Probenpuffer denaturiert. Die Proteine werden dabei trotz verschiedener Eigenladungen nur nach ihrem Molekulargewicht im Acrylamidgel aufgetrennt, da sie durch die Anlagerung von SDS stark negativ geladen sind. Es wurden Gele mit 10-15%igem Trenngel und mit 5%igem Sammelgel verwendet. Die Elektrophorese fand bei konstanten 40 mA für ca. 45-60 Minuten statt.

Das Sammelgel:

- 0,13 M Tris/HCl pH 6,8
- 0,04 % SDS
- 5 % Acrylamid (Stammlösung bestehend aus 30 % Acrylamid und 0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid)
- 1 % Ammoniumpersulfat
- 0,1 % TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)

Das Trenngel:

- 0,4 M Tris/HCl pH 8,8
- 0,04 % SDS
- 10-15 % Acrylamid (Stammlösung bestehend aus 30 % Acrylamid und 0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid)
- 1 % Ammoniumpersulfat
- 0,1 % TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)

### 7.2.3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Schägger und von Jagow (1987)

Für Proteine und Peptide kleiner als 15 kDa wurde bei der eindimensionalen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) das Puffersystem nach Schägger (1987) verwendet. Die Probenvorbereitung erfolgte wie bei SDS-PAGE nach Laemmli (1970). Es wurden Gele mit 15 oder 17,5%igem Trenngel und mit 5%igem Sammelgel verwendet. Die Elektrophorese fand bei konstanten 48 mA für ca. 90 Minuten statt.

Das Sammelgel:

- 0,13 M Tris/HCl pH 6,8
- 0,04 % SDS
- 5 % Acrylamid (Stammlösung bestehend aus 30 % Acrylamid und 0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid)
- 1 % Ammoniumpersulfat
- 0,1 % TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)

Das Trenngel:

- 1 M Tris/HCl pH 8,5
- 0,1 % SDS
- 15-17,5 % Acrylamid (Stammlösung bestehend aus 30 % Acrylamid und 0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid)
- 1 % Ammoniumpersulfat
- 0,1 % TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)

### 7.2.3.6 Coomassie Färbung

Bei der Färbung mit Coomassie werden SDS-Gele unspezifisch angefärbt. Dazu wurde das Gel in Coomassie-Färbelösung in der Mikrowelle aufgekocht und 10 Minuten geschwenkt. Das gefärbte Gel wurde mit Coomassie-Entfärber so lange aufgekocht und geschwenkt, bis die Proteinbanden sichtbar wurden.

### 7.2.3.7 Westernblot

Falls ein Protein spezifisch nachgewiesen werden sollte, wurde das Gel nach der Elektrophorese nicht gefärbt, sondern ein Westernblot durchgeführt. Es wurde die "semidry"-Methode mit Nitrocellulosemembran verwendet, sodass das Protein auf der Membran für eine Antikörperreaktion zugänglich war. Das Gel wurde flankiert von jeweils drei in Westernblotpuffer getränkten 3MM Whatman-Papieren zusammen mit der in Westernblotpuffer getränkten Membran (diese auf der Anodenseite) blasenfrei in die Apparatur gelegt. Der Proteintransfer fand bei  $5 \text{ mA/cm}^2$  für 30 Minuten statt.

Darauf folgte eine Färbung der Membran mit Ponceau-Rot (2 g Ponceau S und 30 g TCA ad 100 ml mit Wasser). Nach Entfärben mit Wasser wurden die Standardbanden und die Gelspuren markiert und der Rest mit TBS entfärbt. Nach dem Entfärben wurde die Membran mit 0,3% BSA in TBS über Nacht blockiert. Es folgten drei 10 minütige Waschschrte mit TBS Tween. Daran schloss sich die Inkubation mit dem primären Antikörper an. Dieser wurde 1:1000 verdünnt in TBS Tween mit 0,3% BSA eingesetzt. Die Inkubation betrug 1 Stunde. Es schloss sich eine Waschphase (3 mal 10 Minuten TBS Tween) an, gefolgt von der einstündigen Inkubation mit dem sekundären Antikörper (peroxidasegekoppelter Antikörper, gerichtet gegen den  $F_c$ -Teil des primären Antikörpers). Dieser wurde 1:10000 verdünnt in TBS Tween mit 0,3% BSA eingesetzt. Nach einer weiteren Waschphase (3 mal 10 Minuten TBS Tween) erfolgte die Entwicklung des Blots mit dem ECL Kit (Amersham, Freiburg), 1 ml von Lösung A wurden mit 25  $\mu\text{l}$  Lösung B gemischt und auf der Blotmembran verteilt. Nach 5 minütiger Inkubation wurde die Aktivität der Peroxidase durch Auflegen eines Röntgenfilms detektiert.

### 7.2.3.8 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentration von Lösungen wurde durch den Coomassie Plus-Kit von PIERCE (Bonn) bestimmt. Ein bekannter Volumenteil Proteinlösung wurde zu 1 ml Reaktionslösung gemischt und 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorptionsänderung bei 595 nm wurde mit einem BSA Standard verglichen und damit die Proteinkonzentration berechnet.

#### 7.2.3.9 Massenspektrometrie

Um die exakte molekulare Masse von Proteinen massenspektrometrisch feststellen zu können, wurde das aufgereinigte Protein mit Hilfe von Austauschphasenchromatographie an einer Nucleosil C4 120 5 $\mu$  53x 2 mm (MZ Analysentechnik, Mainz) quantitativ entsalzt. Dazu wurde das Protein in 0,1 % Tetrafluoressigsäure auf die Säule aufgetragen und mit einem Acetonitrilgradienten eluiert. Das entsalzte Protein wurde von der Arbeitsgruppe Deutzmann massenspektrometrisch analysiert.

#### 7.2.3.10 Edman-Abbau

Um Proteine über den Edman-Abbau ansequenzieren zu können, müssen diese auf eine PVDF Membran geblottet sein. Nach der SDS-PAGE wurde dazu ein Westernblot mit PVDF Membran durchgeführt. Die Membran wurde in Methanol eingeweicht und kurz vor dem Aufschichten auf die Blotapparatur kurz im Westernblotpuffer geschwenkt. Das Gel wurde mit der PVDF-Membran (anodenseitig vom Gel) flankiert von je drei mit Westernblotpuffer getränkten 3MM Whatmanpapieren auf die Blotapparatur gelegt. Der Proteintransfer geschah bei 5 mA/cm<sup>2</sup> für 30 Minuten. Nach dem Proteintransfer wurde die Membran mit PVDF-Färbelösung gefärbt und mit PVDF-Entfärber bis auf die Proteinbanden entfärbt. Anschließend wurde der Blot über Nacht in Wasser geschwenkt, die Bande ausgeschnitten und der Arbeitsgruppe Deutzmann zur Ansequenzierung übergeben.

#### 7.2.3.11 Die Aufreinigung von amyloid- $\beta$ Peptiden

Nach der Spaltung des Fusionsproteins pET14bCAT A $\beta$ <sub>TEV+</sub> Linker mit TEV Protease wurde das unverdaute Fusionsprotein und der Fusionspartner CAT über eine Ni-NTA Chromatographie entfernt. Dazu wurde das während dem Verdau ausgefallene Protein in 125 mM NaOH aufgenommen und nach erfolgter Solubilisierung mit HCl auf pH 9 gebracht. Die Chromatographie erfolgte in 10 mM NH<sub>4</sub>OH / HCOOH pH 9. Der Durchlauf wurde gesammelt und das Säulenmaterial durch Waschen mit 10 mM NH<sub>4</sub>OH / HCOOH pH 9 und 500 mM Imidazol regeneriert. Der Durchlauf wurde auf eine in 10 mM NH<sub>4</sub>OH / HCOOH pH 9 äquilibrierte Resource PRC (GE Healthcare, München) aufgetragen und nach dem

Nachwaschen die Peptide mit einem linearen Gradienten (Elutionspuffer ist 80% Acetonitril in Wasser) von der Säule eluiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels Speedvac eingetrocknet und in 60 µl 1x SDS Probenpuffer aufgenommen.

### 7.3 Fitten von Bindungsisothermen

Um die Kälteschockproteine verschiedener Organismen untereinander vergleichen zu können, ist es sinnvoll, apparente Dissoziationskonstanten zu definieren. Diese werden abgeleitet von zwei verschiedenen Modellen der Inhibition der Proteinexpression im zellfreien System. Im einfacheren Modell basiert die Inhibition auf der Bindung von CSP an eine andere Komponente (z.B. das Plasmid), was deren Funktion bezüglich der Proteinexpression hemmt. Die Aktivität  $A$  der Proteinexpression kann demnach beschrieben werden als

$$A(c_{CSP}^{total}) = A_0 \left( c_{DNA}^{total} - K_{app} - c_{CSP}^{total} + \sqrt{(c_{DNA}^{total} - K_{app} - c_{CSP}^{total})^2 + 4K_{app}c_{DNA}^{total}} \right) \quad (1)$$

mit  $A_0 c_{DNA}^{total}$  als die Proteinexpressionsrate ( $\text{mg ml}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) ohne Zusatz von CSPs,  $c_{CSP}^{total}$  als die absolute Konzentration von CSP,  $c_{DNA}^{total}$  die absolute Konzentration der CSP Bindungsstellen auf dem Plasmid und  $K_{app}$  als die apparente Dissoziationskonstante.

In einer etwas komplexeren Beschreibung wird die Verfügbarkeit des Translationssystems miteinbezogen. Die Proteinexpression wird dabei als proportional zu der Konzentration an ribosomalen Komplexen, die an mRNA gebunden ist, angesehen:

$$A(c_{CSP}^{total}) = A_1 c_{ribo}^{bound} = A_1 (K_{ribo} + Nc_{RNA}^{total} + c_{ribo}^{total} - \sqrt{(K_{ribo} + Nc_{RNA}^{total} + c_{ribo}^{total})^2 - 4Nc_{ribo}^{total}c_{RNA}^{total}}) \quad (2)$$

$A_1$  ist dabei eine passende Normalisationskonstante,  $K_{ribo}$  die apparente Dissoziationskonstante des Transkriptionskomplexes der RNA,  $c_{RNA}^{total}$  die absolute Gleichgewichtskonzentration der mRNA,  $c_{ribo}^{bound}$  die Konzentration der gebundenen Ribosomen und  $c_{ribo}^{total}$  die absolute Ribosomenkonzentration. Die Konzentration an RNA  $c_{RNA}^{total}$  kann nun über Gleichung (1) berechnet werden unter der Annahme, dass  $A_0 c_{DNA}^{total}$  die RNA Konzentration in Abwesenheit von CSP darstellt.

## 8 Zusammenfassung

Die zellfreie Proteinexpression hat sich im Laufe der Zeit von einer Methode der Grundlagenforschung, primär angewandt bei der Aufklärung des genetischen Codes, zu einer sinnvollen präparativ anwendbaren Methode entwickelt. Verantwortlich dafür war zum einen die Entwicklung hochaktiver Lysate vor allem aus *E. coli* oder Weizenkeimlingen, zum anderen aber auch die Anwendung effektiver Translationssysteme auf der Basis viraler Polymerasen und die Etablierung von effizienten Energieregenerationssystemen. Dadurch wurde es möglich, verschiedene Proteine in großen Mengen herzustellen. Jedoch besteht bei dieser Expressionsmethode das Problem, dass viele Proteine nur in einem unzureichenden Umfang exprimiert werden können. Gründe dafür sind unter anderem in der Unzugänglichkeit der frei vorliegenden mRNA und in der Wahl der verwendeten Codonen zu suchen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden deshalb Wege untersucht, um die Expressionsrate von ausgewählten Proteinen unter Verwendung von Lysaten aus *E. coli* zu erhöhen.

Es wurde dabei versucht, zum einen das Expressionssystem selbst zu verändern, und zum anderen das Protein an die Gegebenheiten des auf *E. coli* basierenden Systems anzupassen. Bei der Anpassung des Systems selbst wurde versucht, durch den Zusatz von Kälteschockproteinen, die als RNA-Chaperone angesehen werden, das Niveau an Sekundärstrukturen auf der mRNA zu reduzieren. Denn solche Haarnadelschleifen können dafür verantwortlich sein, dass regulatorische Sequenzen, zum Beispiel Promotoren, dem Translationssystem nicht zugänglich sind und deshalb die mRNA nicht abgelesen werden kann. Entgegen dieser weit verbreiteten Hypothese konnte durch die Titration von CSPs zu der Expression von CAT bzw. Ras keine Erhöhung der Expressionsrate, sondern eine Inhibierung der Reaktion festgestellt werden. Eingehendere Untersuchungen haben ergeben, dass sowohl Transkription als auch Translation von dieser Hemmung betroffen sind und der beschriebene Effekt auf der Nukleotidbindung der CSPs beruht. Daraus konnte der Schluss gezogen werden, dass Kälteschockproteine keine verallgemeinerbare RNA-Chaperonaktivität besitzen, wie in der Literatur beschrieben ist.

Desweiteren wurde untersucht, ob eine Anpassung der Gensequenz eines Proteins an das zellfreie *E. coli* Expressionssystem einen positiven Effekt auf die Expressionsrate haben kann. Dazu wurden von der Firma GENEART hergestellte Varianten des HIV-Capsidproteins p24 verwendet, die entweder die originale Virussequenz, eine auf die humanen Gegebenheiten hin optimierte Version und vor allem eine auf die Anwendung in *E. coli* hin optimierte Version verwendet. Dabei konnte festgestellt werden, dass eine Optimierung der Gensequenz

deutliche Vorteile bei der Expression erbringt. Darüberhinaus wurde p24 an verschiedenen Stellen mit einer optimierten PTD-Domäne versehen. Die Variante des p24, die N-terminal mit einer PTD Domäne fusioniert wurde, konnte als optimal exprimierend und optimal in menschliche Zellen transduzierend beschrieben werden und ist somit der ideale Kandidat für die Etablierung einer Diagnoseprozedur für eine Vakzinierung gegen HIV.

Weiterhin wurden Wege gesucht, um amyloid- $\beta$  Peptide im zellfreien System zu exprimieren. Nachdem festgestellt wurde, dass die Peptide alleine nicht nachweisbar exprimieren, wurden Alternativen gesucht. Die Anwendung von relativ kurzen Fusionstags N-terminal am Peptid erbrachte eine nachweisbare Expression. Je länger dieser Fusionspartner war, umso mehr Peptid konnte im Westernblot detektiert werden. Die Fusion von amyloid- $\beta$  Peptid mit CAT oder GST erbrachte hohe Ausbeuten. Die Präparation des Peptids ausgehend von diesen Fusionsproteinen konnte erfolgreich durchgeführt werden. Dazu wurde das Protein rückgefaltet und das Peptid durch Verdau mit TEV-Protease beinahe quantitativ freigesetzt. Die abschließende Aufreinigung durch  $\text{Ni}^{2+}$  Chelatchromatographie und RP-HPLC konnte das Peptid in Reinform darstellen, jedoch mit sehr hohem Verlust.

Zusammenfassend betrachtet, konnte im Rahmen der Arbeit ein tieferes Verständnis der Funktion der bakteriellen Kälteschockproteine erreicht werden, sowie durch Genoptimierung eine Erhöhung der Expressionsrate von bestimmten Proteinen durchgeführt werden. Weiterhin wurde eine Methode entwickelt, um in einem System der zellfreien Proteinexpression stark aggregierende Peptide herstellen zu können.



## 9 Literaturverzeichnis

Alzheimer A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychisch-gerichtliche Medizin 64, 146-148.

Anderson CW, Straus JW and Dudock BS (1983) Preparation of a cell-free proteinsynthesizing system from wheat germ. Methods Enzymol 101, 635-44.

Baranov VI, Spirin AS. (1993) Gene expression in cell-free system on preparative scale. Methods Enzymol. 217, 123-42.

Bassford PJ Jr, Silhavy TJ, Beckwith JR. (1979) Use of gene fusion to study secretion of maltose-binding protein into Escherichia coli periplasm. J Bacteriol 139, 19-31.

Bennati M, Hertel MM, Fritscher J, Prisner TF, Weiden N, Hofweber R, Spörner M, Horn G, Kalbitzer HR. (2006) High-frequency 94 GHz ENDOR characterization of the metal binding site in wild-type Ras x GDP and its oncogenic mutant G12V in frozen solution. Biochemistry. 45, 42-50.

Berrier C, Park KH, Abes S, Bibonne A, Betton JM, Ghazi A. (2004) Cell-free synthesis of a functional ion channel in the absence of a membrane and in the presence of detergent. Biochemistry 43, 12585-91.

Betton JM. (2004) High throughput cloning and expression strategies for protein production. Biochimie. 86, 601-5.

Brandi A, Pietroni P, Gualerzi CO, Pon CL. (1996) Post-transcriptional regulation of CspA expression in Escherichia coli. Mol Microbiol. 19, 231-240.

Brandi A, Spurio R, Gualerzi CO, Pon CL. (1999) Massive presence of the Escherichia coli 'major cold-shock protein' CspA under non-stress conditions. EMBO J. 18, 1653- 1659.

Broeze RJ, Solomon CJ, Pope DH. (1978) Effects of low temperature on in vivo and in vitro protein synthesis in Escherichia coli and Pseudomonas fluorescens. J Bacteriol. 134, 861-74.

Brooks H, Lebleu B, Vives E. (2005) Tat peptide-mediated cellular delivery: back to basics. Adv Drug Deliv Rev. 57, 559-77.

Buchberger B. et al. (2002) Matrix reactor: A new scalable principle for cell-free protein expression. In Cell-Free Translation Systems (Spirin AS ed.), pp. 121-128, Springer.

Christendat D, Yee A, Dharamsi A, Kluger Y, Gerstein M, Arrowsmith CH, Edwards AM. (2000) Structural proteomics: prospects for high throughput sample preparation. Prog Biophys Mol Biol. 73, 339-45.

Chumpolkulwong N, Hori-Takemoto C, Hosaka T, Inaoka T, Kigawa T, Shirouzu M, Ochi K, Yokoyama S. (2004) Effects of Escherichia coli ribosomal protein S12 mutations on cell-free protein synthesis. Eur J Biochem. 271, 1127-34.

- Citron M, Westaway D, Xia W, Carlson G, Diehl T, Levesque G, Johnson-Wood K, Lee M, Seubert P, Davis A, Kholodenka D, Motter R, Sherrington R, Perry B, Yao-H, Strome R, Lieberburg I, Rommens J, Kim S, Schenk D, Fraser P, St. George-Hyslop P and Selkoe DJ. (1997) Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid b-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nature Med* 3, 67-72.
- Collins-Racie LA, McColgan JM, Grant KL, DiBlasio-Smith EA, McCoy JM, LaVallie ER. (1995) Production of recombinant bovine enterokinase catalytic subunit in *Escherichia coli* using the novel secretory fusion partner DsbA. *Biotechnology* 13, 982-7.
- Console S, Marty C, Garcia-Echeverria C, Schwendener R, Ballmer-Hofer K. (2003) Antennapedia and HIV transactivator of transcription (TAT) "protein transduction domains" promote endocytosis of high molecular weight cargo upon binding to cell surface glycosaminoglycans. *J Biol Chem*. 278, 35109-14.
- Crescenzi O, Tomaselli S, Guerrini R, Salvadori S, D'Ursi AM, Temussi PA, Picone D. (2002). Solution structure of the Alzheimer amyloid beta-peptide (1-42) in an apolar microenvironment. Similarity with a virus fusion domain. *Eur J Biochem* 269, 5642-5648.
- DeVries J, and Zubay G (1967): DNA-directed peptide synthesis. II. The synthesis of the atfragment of the enzyme  $\beta$ -galactosidase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 57, 1010-1012.
- Dingwall C (2001). Spotlight on BACE: The secretases as targets for treatment in Alzheimer disease. *Journal of Clinical Investigation*, 108, 1243-1246.
- Dowbenko DJ, Bell JR, Benton CV, Groopman JE, Nguyen H, Vetterlein D, Capon DJ, Lasky LA. (1985) Bacterial expression of the acquired immunodeficiency syndrome retrovirus p24 gag protein and its use as a diagnostic reagent. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 82, 7748-52.
- Endo Y, Otsuzuki S, Ito K, Miura K (1992). Production of an enzymatic active protein using a continuous flow cell-free translation system. *J Biotechnol*. 25, 221-30.
- Endo Y, Sawasaki T. (2004) High-throughput, genome-scale protein production method based on the wheat germ cell-free expression system. *J Struct Funct Genomics*. 5, 45-57.
- Ermolenko DN, Makhatadze GI. (2002) Bacterial cold-shock proteins. *Cell Mol Life Sci* 59, 1902-13.
- Evdokimova VM and Ovchinnikov LP (1999) Translational regulation by Y-box transcription factor: involvement of the major mRNA-associated protein, p50. *Int J Biochem Cell Biol*. 31, 139-149.
- Fittipaldi A, Ferrari A, Zoppe M, Arcangeli C, Pellegrini V, Beltram F, Giacca M. (2003) Cell membrane lipid rafts mediate caveolar endocytosis of HIV-1 Tat fusion proteins. *J Biol Chem*. 278, 34141-9.
- Frankel AD, Young JA. (1998) HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem*. 67, 1-25.

- Friedman H, Lu P and Rich A (1971) Temperature control of initiation of protein synthesis in *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* 61, 105-121.
- Futaki S, Goto S, Sugiura Y. (2003) Membrane permeability commonly shared among arginine-rich peptides. *J Mol Recognit.* 16, 260-4.
- Gazit E, Lee WJ, Brey PT, Shai Y. (1994) Mode of action of the antibacterial cecropin B2: a spectrofluorometric study. *Biochemistry* 33, 10681-92.
- Giuliodori AM, Brandi A, Gualerzi CO, Pon CL. (2004) Preferential translation of cold-shock mRNAs during cold adaptation. *RNA* 10, 265-276.
- Golde TE, Eckman CB. (2001) Cholesterol modulation as an emerging strategy for the treatment of Alzheimer's disease. *Drug Discov Today* 6, 1049-1055.
- Graumann P, Marahiel MA. (1994) The major cold shock protein of *Bacillus subtilis* CspB binds with high affinity to the ATTGG-and CCAAT sequences in single stranded oligonucleotides. *FEBS Lett.* 3381 157-60.
- Graumann P, Schroder K, Schmid R, Marahiel MA. (1996) Cold shock stress-induced proteins in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 178, 4611-9.
- Graumann PL and Marahiel MA (1996) Some like it cold: response of microorganisms to cold shock. *Arch Microbiol.* 166, 293-300.
- Graumann PL, Marahiel MA. (1999) Cold shock response in *Bacillus subtilis*. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 1, 203-9.
- Gualerzi CO, Giuliodori AM, Pon CL. (2003) Transcriptional and Post-transcriptional Control of Cold-shock Genes. *J Mol Biol.* 331, 527-539.
- Guignard L, Ozawa K, Pursglove SE, Otting G, Dixon NE. (2002) NMR analysis of in vitro-synthesized proteins without purification: a high-throughput approach. *FEBS Lett.* 524, 159-62.
- Gupta B, Levchenko TS, Torchilin VP. (2005) Intracellular delivery of large molecules and small particles by cell-penetrating proteins and peptides. *Adv Drug Deliv Rev.* 57, 637-51.
- Hartmann T. (2001) Cholesterol, A beta and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 24, 45-8.
- Herz J, Beffert U. (2000) Apolipoprotein E receptors: linking brain development and Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* 1, 51-8.
- Hoagland MB, Stephenson ML, Scott JF, Hecht LI, and Zamecnik PC. (1958) A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis. *J Biol Chem.* 231, 241-257.
- Ho A, Schwarze SR, Mermelstein SJ, Waksman G, Dowdy SF. (2001) Synthetic protein transduction domains: enhanced transduction potential in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 61, 474-7.

Hofweber Roland (2003) In vitro Expression und ENDOR-spektroskopische Analyse des Proteins p21-Ras; Diplomarbeit, Uni Regensburg.

Hofweber R, Horn G, Langmann T, Balbach J, Kremer W, Schmitz G, Kalbitzer HR. (2005) The influence of cold shock proteins on transcription and translation studied in cell-free model systems. *FEBS J.* 272, 4691-702.

Hortschansky P, Schroeckh V, Christopeit T, Zandomeneghi G, Fandrich M. (2005) The aggregation kinetics of Alzheimer's beta-amyloid peptide is controlled by stochastic nucleation. *Protein Sci.* 14, 1753-9.

Huse JT, & Doms RW. (2000). Closing in on the amyloid cascade: Recent insights into the cell biology of Alzheimer's disease. *Molecular Neurobiology* 22, 81-98.

Ishihara G, Goto M, Saeki M, Ito K, Hori T, Kigawa T, Shirouzu M, Yokoyama S. (2005) Expression of G protein coupled receptors in a cell-free translational system using detergents and thioredoxin-fusion vectors. *Protein Expr Purif.* 41, 27-37.

Izumi H, Imamura T, Nagatani G, Ise T, Murakami T, Uramoto H, Torigoe T, Ishiguchi H, Yoshida Y, Nomoto M, Okamoto T, Uchiumi T, Kuwano M, Kuna K, Kohno K (2001) Y box-binding protein-1 binds preferentially to single-stranded nucleic acids and exhibits 3'-5' exonuclease activity. *Nucleic Acids Res.* 29, 1200-1207.

Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT Jr. (1993) The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 32, 4693-7.

Jancarik J, de Vos A, Kim SH, Miura K, Ohtsuka E, Noguchi S, Nishimura S. (1988) Crystallization of human c-H-ras oncogene products. *J Mol Biol.* 200, 205-7.

Janek K, Rothmund S, Gast K, Beyermann M, Zipper J, Fabian H, Bienert M, Krause E. (2001). Study of the conformational transition of A beta(1-42) using D-amino acid replacement analogues. *Biochemistry* 40, 5457-5463.

Jewett, M.C. and Swartz, J.R. (2004) Mimicking the Escherichia coli cytoplasmic environment activates long-lived and efficient cell-free protein synthesis. *Biotechnol Bioeng.* 86, 19-26.

Jermutus L, Ryabova LA, Pluckthun A. (1998) Recent advances in producing and selecting functional proteins by using cell-free translation. *Curr Opin Biotechnol* 9, 534-48.

Jiang W, Hou Y. and Inouye M. (1997) CspA, the major coldshock protein of Escherichia coli, is an RNA chaperone. *J. Biol. Chem.* 272, 196-202.

Jones PG, VanBogelen RA, Neidhardt FC. (1987) Induction of proteins in response to low temperature in Escherichia coli. *J Bacteriol.* 169, 2092-5.

Kakio A, Nishimoto S, Yanagisawa K, Kozutsumi Y, Matsuzaki K. (2002) Interactions of amyloid beta-protein with various gangliosides in raft-like membranes: importance of GM1 ganglioside-bound form as an endogenous seed for Alzheimer amyloid. *Biochemistry* 41, 7385-90.

Kainosho M, Torizawa T, Iwashita Y, Terauchi T, Mei Ono A, Guntert P. (2006) Optimal isotope labelling for NMR protein structure determinations. *Nature*. 440, 52-7.

Kapust RB, Tozser J, Copeland TD, Waugh DS. (2002) The P1' specificity of tobacco etch virus protease. *Biochem Biophys Res Commun*. 294, 949-55.

Katzen F, Chang G, Kudlicki W. (2005) The past, present and future of cell-free protein synthesis. *Trends Biotechnol*. 23, 150-6.

Klammt C, Lohr F, Schafer B, Haase W, Dotsch V, Ruterjans H, Glaubitz C, Bernhard F. (2004) High level cell-free expression and specific labeling of integral membrane proteins. *Eur J Biochem*. 271, 568-80.

Kiga D, Sakamoto K, Kodama K, Kigawa T, Matsuda T, Yabuki T, Shirouzu M, Harada Y, Nakayama H, Takio K, Hasegawa Y, Endo Y, Hirao I, Yokoyama S. (2002) An engineered *Escherichia coli* tyrosyl-tRNA synthetase for site-specific incorporation of an unnatural amino acid into proteins in eukaryotic translation and its application in a wheat germ cell-free system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99, 9715-20.

Kigawa T, Muto Y and Yokoyama S (1995) Cell-free synthesis and amino acid-selective stable isotope labelling of proteins for NMR analysis. *J Biomol NMR* 6, 129-134.

Kigawa T, Yabuki T, Yoshida Y, Tsutsui M, Ito Y, Shibata T, Yokoyama S (1999) Cellfree production and stable-isotope labeling of milligram quantities of proteins. *FEBS Letters* 442, 15-19.

Kigawa T, Yamaguchi-Nunokawa E, Kodama K, Matsuda T, Yabuki T, Matsuda N, Ishitani R, Nureki O, Yokoyama S. (2002) Selenomethionine incorporation into a protein by cell-free synthesis. *J Struct Funct Genomics*. 2, 29-35.

Kigawa T, Yabuki T, Matsuda N, Matsuda T, Nakajima R, Tanaka A, Yokoyama S. (2004) Preparation of *Escherichia coli* cell extract for highly productive cell-free protein expression. *J Struct Funct Genomics*. 5, 63-8.

Kim DM, Choi CY (1996) A semicontinuous prokaryotic coupled transcription/translation system using a dialysis membrane. *Biotechnol Prog*. 12, 645-649.

Kim DM, Swartz JR (1999) Prolonging cell-free protein synthesis with a novel ATP regeneration system. *Biotechnol Bioeng*. 66, 180-8.

Kim DM and Swartz JR (2000) Prolonging cell-free protein synthesis by selective reagent additions. *Biotechnol Prog*. 16, 385-390.

Kim DM and Swartz JR (2001) Regeneration of adenosine triphosphate from glycolytic intermediates for cell-free protein synthesis. *Biotechnol Bioeng*. 74, 309-316.

Kim DM and Swartz JR (2004) Efficient production of a bioactive, multiple disulfide-bonded protein using modified extracts of *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*. 85, 122-129.

- Kim DT, Mitchell DJ, Brockstedt DG, Fong L, Nolan GP, Fathman CG, Engleman EG, Rothbard JB. (1997) Introduction of soluble proteins into the MHC class I pathway by conjugation to an HIV tat peptide. *J Immunol.* 159, 1666-8.
- Kim JR, Muresan A, Lee KY, Murphy RM. (2004) Urea modulation of beta-amyloid fibril growth: experimental studies and kinetic models. *Protein Sci.* 13, 2888-98.
- Kimberly WT, Xia W, Rahmati T, Wolfe MS, Selkoe DJ. (2000) The transmembrane aspartates in presenilin 1 and 2 are obligatory for gamma-secretase activity and amyloid beta-protein generation. *J Biol Chem.* 275, 3173-8.
- Knapp KG and Swartz JR (2004) Cell-free production of active *E. coli* thioredoxin reductase and glutathione reductase. *FEBS Lett.* 559, 66-70.
- Kolb VA, Makeyev EV, Spirin AS. (1994) Folding of firefly luciferase during translation in a cell-free system. *EMBO J.* 13, 3631-3637.
- Kolb VA, Makeyev EV, Spirin AS. (2000) Co-translational folding of an eukaryotic multidomain protein in a prokaryotic cell-free system. *J Biol Chem.* 275, 16597-16601.
- Komar AA, Kommer A, Krashennnikov IA, Spirin AS (1997) Cotranslational folding of globin. *J Biol Chem.* 272, 10646-10651.
- Kremer W, Schuler B, Harrieder S, Geyer M, Gronwald W, Welker C, Jaenicke R, Kalbitzer HR. (2001) Solution NMR structure of the coldshock protein from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Eur J Biochem.* 268: 2527-2539.
- Kremer, W. High-Pressure NMR Studies in Proteins (2006) *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, 57, 177-203.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lehmann, D and Wedekind, F (2003) Optimization of cell-free expression of FAD-dependent D-amino acid oxidase. In *Cell-Free Protein Expression* (Swartz JR ed.), pp. 159-164.
- Leifert JA, Holler PD, Harkins S, Kranz DM, Whitton JL. (2003) The cationic region from HIV tat enhances the cell-surface expression of epitope/MHC class I complexes. *Gene Ther.* 10, 2067-73.
- Lesley SA, Brow, MA, Burgess RR (1991) Use of in vitro synthesis from polymerase chain reaction-generated templates to study interaction of *Escherichia coli* transcription factors with core RNA polymerase and for epitope mapping of monoclonal antibodies. *J Biol Chem.* 262, 2632-2638.
- Ling Y, Morgan K, Kalsheker N. (2003) Amyloid precursor protein (APP) and the biology of proteolytic processing: relevance to Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 35, 1505-35.

Lopez MM, Yutani K and Makhatadze GI (1999) Interactions of the major cold shock protein of *Bacillus subtilis* CspB with single-stranded DNA templates of different base composition. *J Biol Chem.* 274, 33601-33608.

Lopez MM and Makhatadze GI (2000) Major cold shock proteins, CspA from *Escherichia coli* and CspB from *Bacillus subtilis*, interact differently with single-stranded DNA templates. *Biochim Biophys Acta* 1479, 196-202.

Lopez MM, Yutani K and Makhatadze GI (2001) Interactions of the cold shock protein CspB from *Bacillus subtilis* with single-stranded DNA. Importance of the T base content and position within the template. *J Biol Chem.* 276, 15511-15518.

Lundberg M, Wikstrom S, Johansson M. (2003) Cell surface adherence and endocytosis of protein transduction domains. *Mol Ther.* 8, 143-50.

Madin K, Sawasaki T, Ogasawara T, Endo Y. (2000) A highly efficient and robust cell-free protein synthesis system prepared from wheat embryos: Plants apparently contain a suicide system directed at ribosomes. *Proc Natl Acad Sci. U. S. A.* 97, 559-564.

Martemyanov KA, Spirin AS, Gudkov AT. (1997) Direct expression of PCR products in a cell-free transcription/translation system: synthesis of antibacterial peptide cecropin. *FEBS Lett* 414, 268-70.

Matsumoto K. and Wolffe A. P. (1998) Gene regulation by Ybox proteins: coupling control of transcription and translation. *Trends Cell Biol.* 8, 318-323.

Matthaei JH, Nirenberg MW. (1961) Characteristics and stabilization of DNAase-sensitive protein synthesis in *E. coli* extracts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 47, 1580-8.

Matveev SV, Illarionov BA, Vysotski ES, Bondar VS, Markova SV, Alakhov YB. (1995) Obelin mRNA-a new tool for studies of translation in cell-free systems. *Anal* 231, 34-9.

McLaurin J, Franklin T, Fraser PE, Chakrabartty A. (1998) Structural transitions associated with the interaction of Alzheimer beta-amyloid peptides with gangliosides. *J Biol Chem.* 273, 4506-15.

Merrifield RB (1965) Automated Synthesis of Peptides. *Science* 150, 178-185

Michel-Reydellet N, Calhoun K, Swartz J. (2004) Amino acid stabilization for cell-free protein synthesis by modification of the *Escherichia coli* genome. *Metab Eng.* 6, 197-203.

Miura K, Inoue Y, Nakamori H, Iwai S, Ohtsuka E, Ikehara M, Noguchi S, Nishimura S. (1986) Synthesis and expression of a synthetic gene for the activated human c-Ha-ras protein. *Jpn J Cancer Res.* 77, 45-51.

Miyazaki-Imamura C, Oohira K, Kitagawa R, Nakano H, Yamane T, Takahashi H. (2003) Improvement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stability of manganese peroxidase by combinatorial mutagenesis and high throughput screening using in vitro expression with protein disulfide isomerase. *Protein Eng.* 16, 423-428.

- Mueller U, Perl D, Schmid FX and Heinemann U (2000) Thermal stability and atomic-resolution crystal structure of the *Bacillus caldolyticus* cold shock protein. *J Mol Biol.* 297, 975-988.
- Nathans D, Notani G, Schwartz JH and Zinder ND (1962) Biosynthesis of the coat protein of coliphage f2 by *E. coli* extracts. *Proc Natl Acad Sci. USA* 48, 1424-1431.
- Nirenberg MW, Matthaei JH. (1961) The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA.* 47, 1588-602.
- Nemetz C, Reichhuber R, Schweizer R, Hloch P, Watzele M. (2001) Reliable quantification of in vitro synthesized green fluorescent protein: comparison of fluorescence activity and total protein levels. *Electrophoresis.* 22, 966-9.
- Nevin DE and Pratt JM (1991) A coupled in vitro transcription-translation system for the exclusive synthesis of polypeptides expressed from the T7 promoter. *FEBS Lett*, 291, 259-63.
- Newkirk K, Feng W, Jiang W, Tejero R, Emerson SD, Inouye M, Montelione GT (1994) Solution NMR structure of the major cold shock protein (CspA) from *Escherichia coli*: identification of a binding epitope for DNA. *Proc Natl Acad Sci. USA* 91, 5114-5118.
- Parks TD, Leuther KK, Howard ED, Johnston SA, Dougherty WG. (1994) Release of proteins and peptides from fusion proteins using a recombinant plant virus proteinase. *Anal Biochem.* 216, 413-7.
- Petkova AT, Ishii Y, Balbach JJ, Antzutkin ON, Leapman RD, Delaglio F, Tycko R. (2002). A structural model for Alzheimer's  $\beta$ -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 16742-16747.
- Pouny Y, Rapaport D, Mor A, Nicolas P, Shai Y. (1992) Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry.* 31, 12416-23.
- Pratt, J.M. (1984) Coupled transcription translation in prokaryotic cell-free systems. In *Transcription and Translation. A Practical Approach.* (Hames BD & Higgins SJ, eds), pp. 179-209. IRL Press, Oxford.
- Ohuchi S, Nakano H, Yamane T. (1998) In vitro method for the generation of protein libraries using PCR amplification of a single DNA molecule and coupled transcription/translation. *Nucleic Acids Res.* 26, 4339-4346.
- Raab, David (2003) Entwicklung eines integrierten Softwarepaketes zur Unterstützung des Designs und der Synthese artifizieller Gene in einer Hochdurchsatz-Umgebung, Doktorarbeit Regensburg.
- Riek R, Guntert P, Dobeli H, Wipf B, Wuthrich K. (2001). NMR studies in aqueous solution fail to identify significant conformational differences between the monomeric forms of two Alzheimer peptides with widely different plaque-competence, A $\beta$ (1-40)(ox) and A $\beta$ (1-42)(ox). *Eur J Biochem* 268, 5930-5936.



- Ryabova LA, Ortlepp SA and Baranov VI (1989) Preparative synthesis of globin in a continuous cell-free translation system from rabbit reticulocytes. *Nucleic Acids Res*, 17, 4412.
- Ryabova LA, Desplancq D, Spirin AS, Pluckthurn A (1997) Functional antibody production using cellfree translation: Effect of protein disulfide isomerase and chaperones. *Nat Biotechnol*. 15, 79-84.
- Ryabova LA, Morozov IYu, Spirin AS. (1998) Continuous-flow cell-free translation, transcription-translation, and replication-translation systems. *Methods Mol Biol* 77, 179-93.
- Rungpragayphan S, Kawarasaki Y, Imaeda T, Kohda K, Nakano H, Yamane T. (2002) High-throughput, cloning-independent protein library construction by combining single-molecule DNA amplification with in vitro expression. *J Mol Biol*. 318, 395-405.
- Rungpragayphan S, Nakano H, Yamane T. (2003) PCR-linked in vitro expression: a novel system for high-throughput construction and screening of protein libraries. *FEBS Lett*. 540, 147-50.
- Sawasaki T, Ogasawara T, Morishita R, Endo Y. (2002) A cell-free protein synthesis system for high-throughput proteomics. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99, 14652-14657.
- Schägger H. and von Jagow G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical biochemistry* 166, 368-379
- Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, Bird TD, Hardy J, Hutton M, Kukull W, Larson E, Levy-Lahad E, Viitanen M, Peskind E, Poorkaj P, Schellenberg G, Tanzi R, Wasco W, Lannfelt L, Delkoe DJ, and Younkin S. (1996) Secreted amyloid b-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nature Med* 2, 864-870.
- Schnuchel A, Wiltscheck R, Ceisch M, Herrler M, Willmsky G, Graumann P, Marahiel MA, Holak TA. (1993) Structure in solution of the major cold-shock protein from *Bacillus subtilis*. *Nature* 364, 169-171.
- Selkoe DJ. (2002). Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 298, 789-791.
- Serpell LC. (2000) Alzheimer's amyloid fibrils: structure and assembly. *Biochim Biophys Acta*. 1502, 16-30.
- Shaw WV. (1975) Chloramphenicol acetyltransferase from chloramphenicol-resistant bacteria. *Methods Enzymol*. 43, 737-55.
- Shibagaki N, Udey MC. (2003) Dendritic cells transduced with TAT protein transduction domain-containing tyrosinase-related protein 2 vaccinate against murine melanoma. *Eur J Immunol*. 33, 850-60.
- Shirahama T, Cohen AS. (1967) High-resolution electron microscopic analysis of the amyloid fibril. *J Cell Biol*. 33, 679-708.

Shirokov, V.A. et al. (2002) Continuous-flow and continuous-exchange cell-free translation systems and reactors. In *Cell-Free Translation Systems* (Spirin AS ed.), pp. 91-107, Springer.

Simons K, Ehehalt R. (2002) Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin Invest.* 110, 597-603.

Smith DB, Johnson KS. (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene.* 67, 31-40.

Spirin AS, Baranov VI, Ryabova LA, Ovodov SY and Alakhov YB (1988) A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield. *Science*, 242, 1162-4.

Spirin AS (1992) Cell-free protein synthesis bioreactor. In *Frontiers in Bioprocessing II* (Todd, P., Sikdar, S.K. and Beer, M. eds), pp. 31-43, American Chemical Society.

Spirin AS. (2004) High-throughput cell-free systems for synthesis of functionally active proteins. *Trends Biotechnol.* 22, 538-45.

Spirin AS 2002. *Cell-Free Translation Systems*. Springer, Berlin.

Stols L, Gu M, Dieckman L, Raffin R, Collart FR, Donnelly MI. (2002) A new vector for high-throughput, ligation-independent cloning encoding a tobacco etch virus protease cleavage site. *Protein Expr Purif.* 25, 8-15.

Thieringer HA, Jones PG, Inouye M. (1998) Cold shock and adaptation. *Bioessays.* 20, 49-57.

Vives E. (2003) Cellular uptake [correction of uptake] of the Tat peptide: an endocytosis mechanism following ionic interactions. *J Mol Recognit.* 16, 265-71.

Von König, Konstanze: Charakterisierung der Oligonucleotidbindung durch das Kälteschockprotein aus *Thermotoga maritima* Diplomarbeit, 2003.

Watson AA, Fairlie DP, Craik DJ. (1998). Solution structure of methionine-oxidized amyloid beta-peptide (1-40). Does oxidation affect conformational switching? *Biochemistry* 37, 12700-12706.

Weber M. H., Beckering C. L. and Marahiel M. A. (2001) Complementation of cold shock proteins by translation initiation factor IF1 in vivo. *J Bacteriol.* 183, 7381-7386.

Weinfurter Daniel, (2003) *In Vitro-Expression von Proteinen, Intein-Spleißen und Homologiemodellierung mit Durchschnittswinkeln als Werkzeuge der NMR-Strukturanalyse*. Diplomarbeit, Uni Regensburg.

Wilkinson MF and Shyu AB (2001) Multifunctional regulatory proteins that control gene expression in both the nucleus and the cytoplasm. *Bioessays* 23, 775-787.

Yabuki T, Kigawa T, Dohmae N, Takio K, Terada T, Ito Y, Laue ED, Cooper JA, Kainosho M, Yokoyama S. (1998) Dual amino acid-selective and site-directed stable-isotope labeling of the human c-Ha-Ras protein by cell-free synthesis. *J Biomol NMR.* 11, 295-306.

- Yamanaka K, Fang L and Inouye M (1998) The CspA family in *Escherichia coli*: multiple gene duplication for stress adaptation. *Mol Microbiol.* 27, 247-255.
- Yin G and Swartz JR (2004) Enhancing multiple disulfide bonded protein folding in a cell-free system. *Biotechnol Bioeng.* 86, 188-195.
- Yokoyama S, Hirota H, Kigawa T, Yabuki T, Shirouzu M, Terada T, Ito Y, Matsuo Y, Kuroda Y, Nishimura Y, Kyogoku Y, Miki K, Masui R, Kuramitsu S. (2000) Structural genomics projects in Japan. *Nat Struct Biol.* 7 Suppl:943-5.
- Yokoyama S. (2003) Protein expression systems for structural genomics and proteomics. *Curr Opin Chem Biol.* 7, 39-43.
- Zamecnik PC, Stephenson ML, Hecht, LI. (1958) Intermediate Reactions in Amino Acid Incorporation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 44,73-8.
- Zawadzki V, Gross HR (1991) Rapid and simple purification of T7 RNA polymerase. *Nucl Acids Res.* 19, 1948.
- Zubay G (1973) In vitro synthesis of protein in microbial systems. *Annu Rev Genet.*, 7, 267-287.
- Zuker M, and Stiegler P (1981) Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. *Nucleic Acids Res.* 9, 133-148.

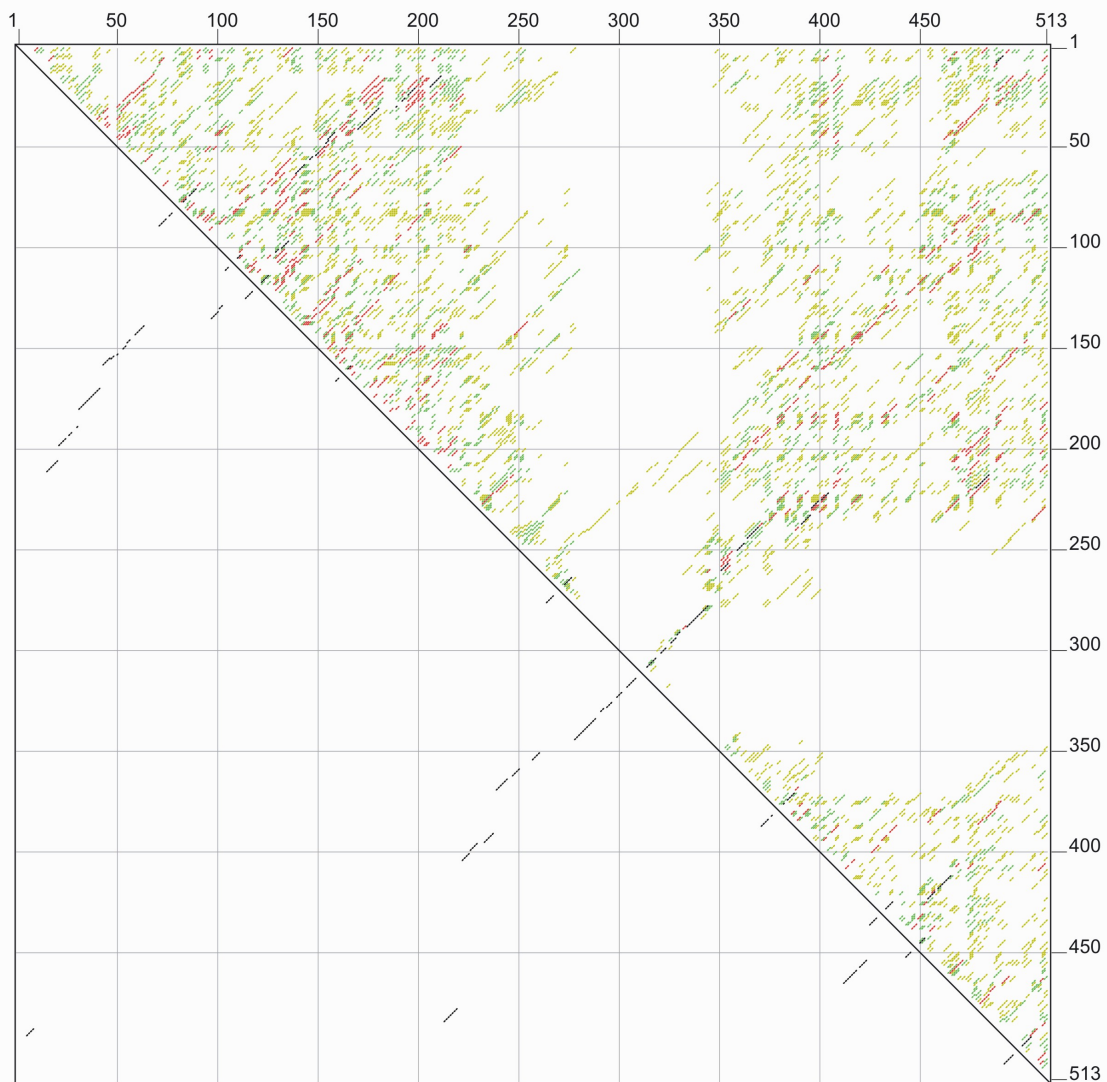
# 10 Anhang

## 10.1 Energy dot plots:

boxplot\_ng by D. Stewart and M. Zuker  
© 2004 Washington University

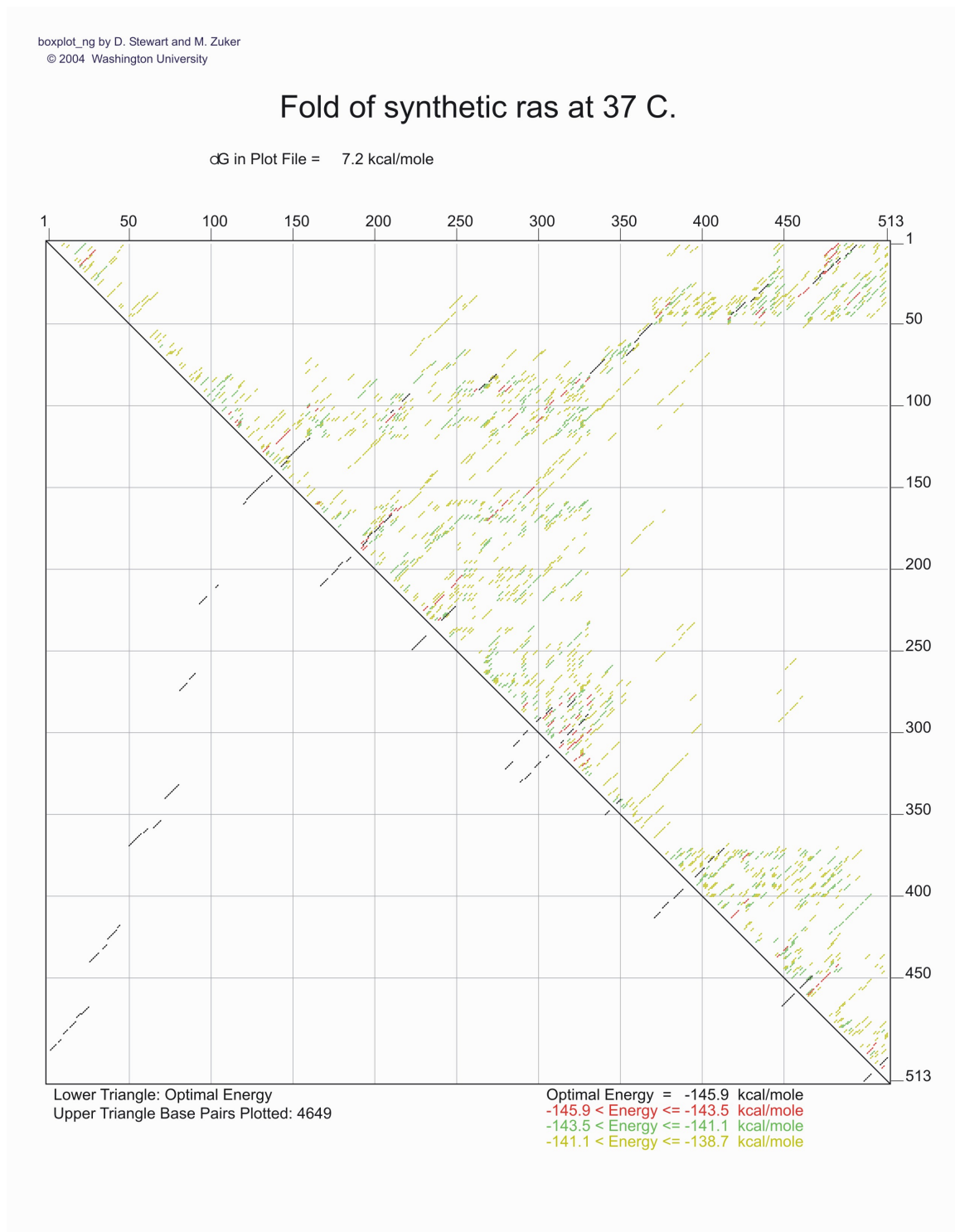
Fold of human ras at 37 C.

dG in Plot File = 10.2 kcal/mole



Lower Triangle: Optimal Energy  
Upper Triangle Base Pairs Plotted: 11648

Optimal Energy = -204.2 kcal/mole  
-204.2 < Energy <= -200.8 kcal/mole  
-200.8 < Energy <= -197.4 kcal/mole  
-197.4 < Energy <= -194.0 kcal/mole



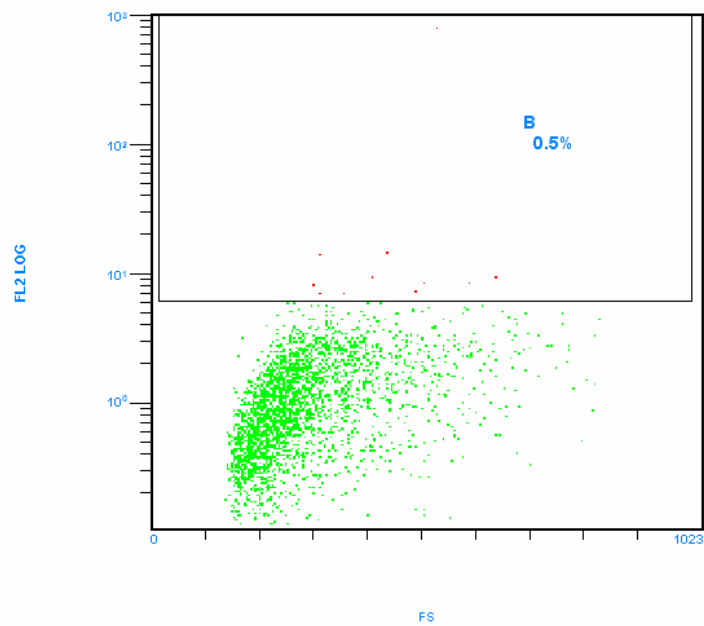
Dotplots der möglichen intramolekularen mRNA Basenpaarungen von humanem Ras (pET14b Ras) und von synthetischem Ras (pK7 Ras). Die optimalen Energien unterscheiden sich um 58,3 kcal/ mol entsprechend 245 KJ / mol (kalkuliert mit dem Programm MFOLD (Zuker *et al.*, 1981)).

## 10.2 Durchflusszytometrie nach p24 Applikation auf 293T Zellen

Intrazelluläre Messung nach 2 Stunden Inkubationsdauer

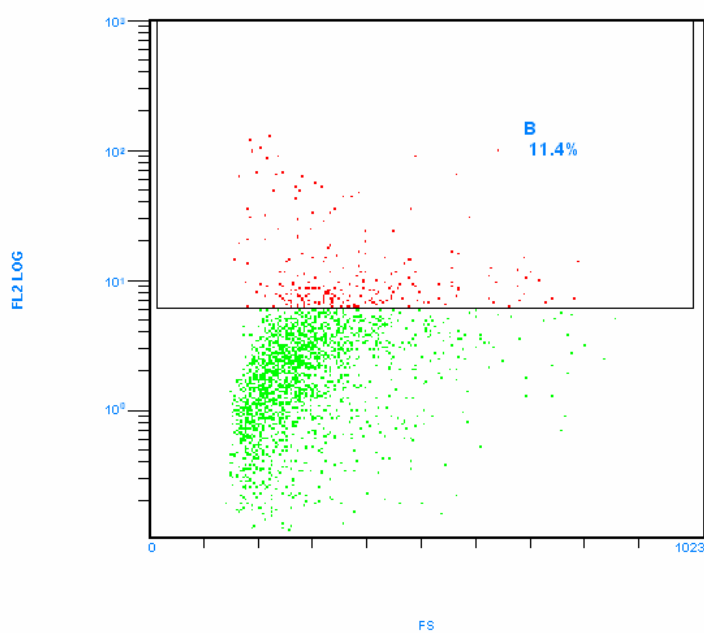
### 293 T Zellen (Nullansatz)

(F1)[A] 15 00003812 2315.LMD : FS LIN/FL2 LOG - ADC



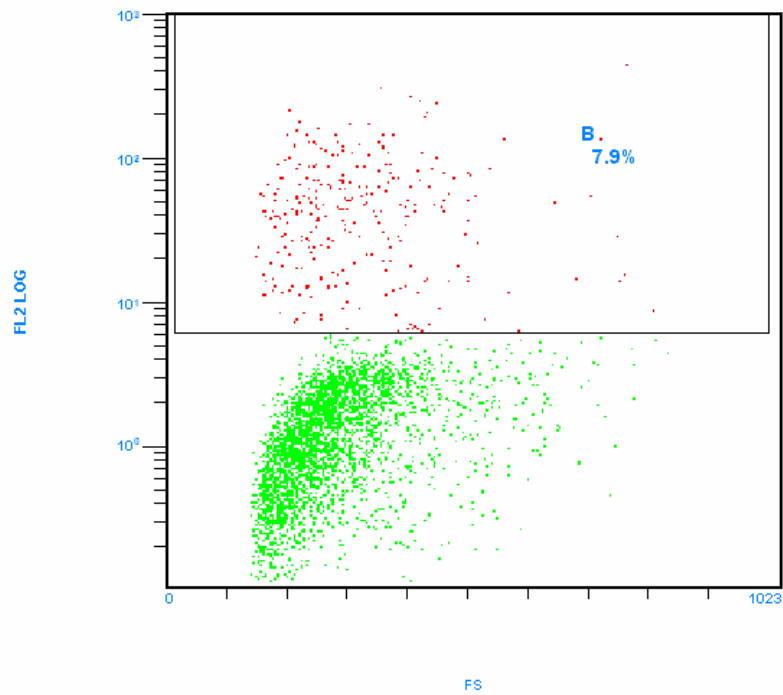
### 293T Zellen mit EHV gpn

(F1)[A] 16 00003813 2316.LMD : FS LIN/FL2 LOG - ADC

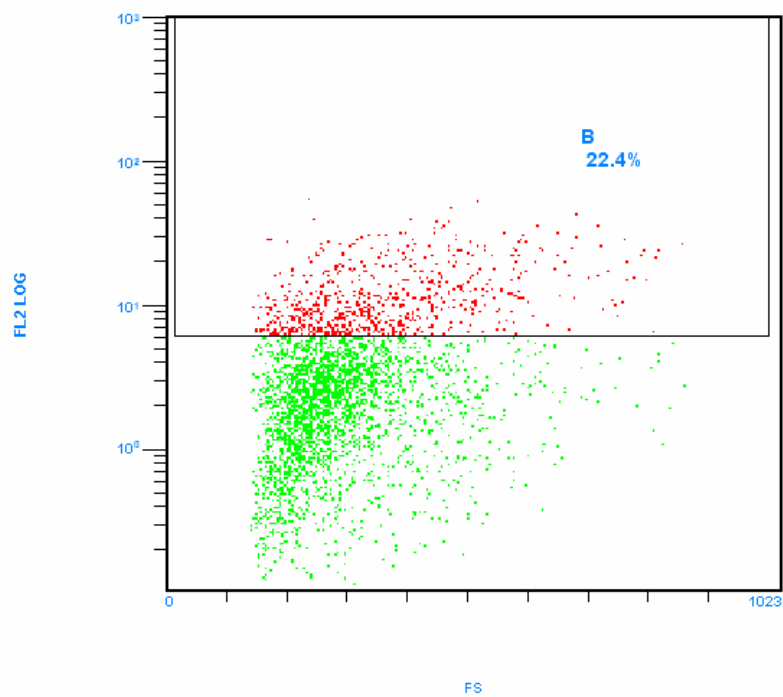


**293T Zellen mit p24 ohne PTD**

(F1)[A] I4 00003814 2317.LMD : FS LIN/FL2 LOG - ADC

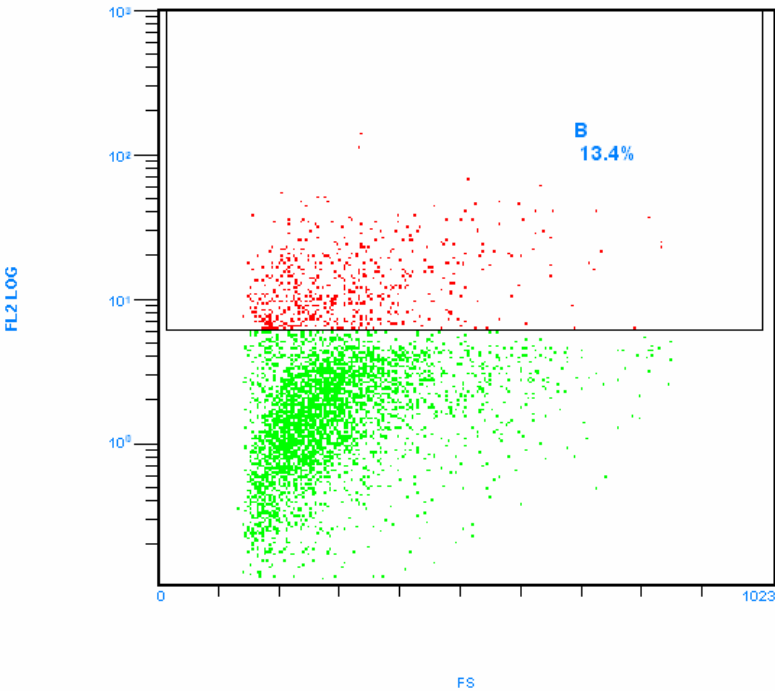
**293T Zellen mit p24 (N-term. PTD)**

(F1)[A] I1 00003817 2320.LMD : FS LIN/FL2 LOG - ADC



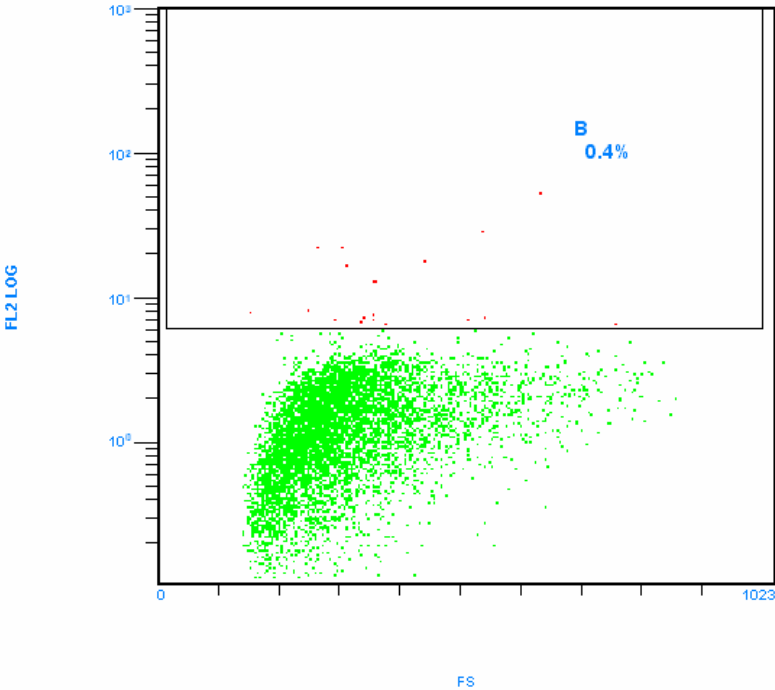
293T Zellen mit p24 (C-term. PTD)

[F1][A] I2 00003816 2319.LMD : FS LIN/FL2 LOG - ADC



293T Zellen mit p24 (interne PTD)

[F1][A] I3 00003815 2318.LMD : FS LIN/FL2 LOG - ADC

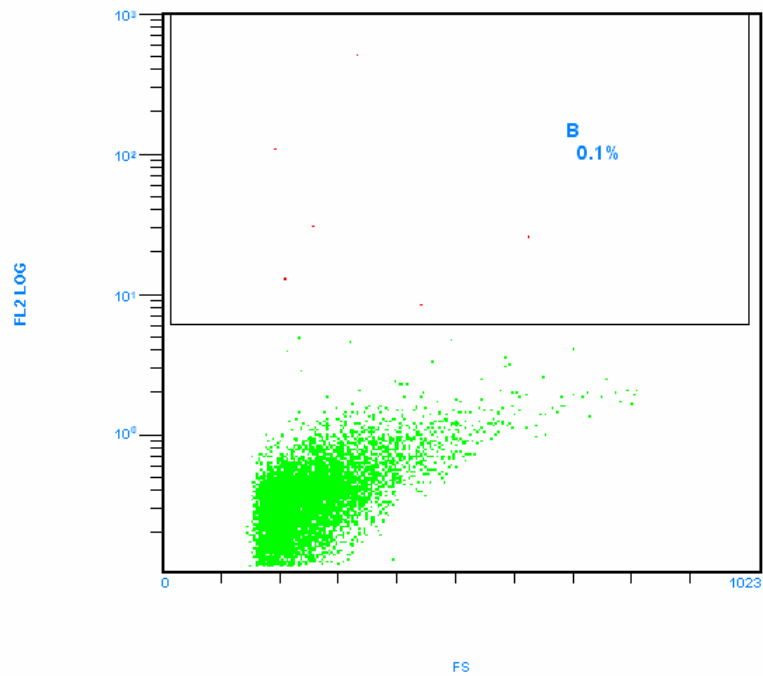




Extrazelluläre Messung nach 2 Stunden Inkubationsdauer

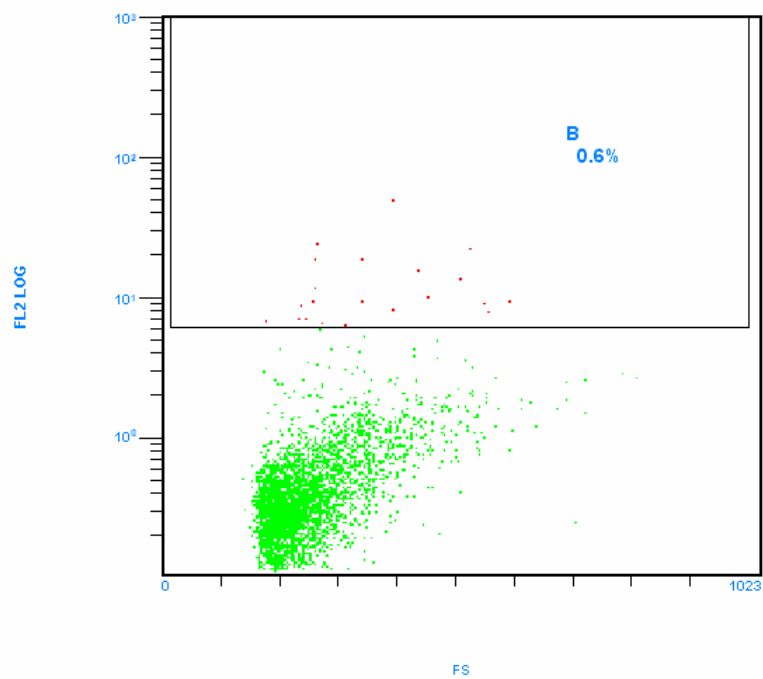
### 293 T Zellen (Nullansatz)

(F1)[A] 5En 00003818 2321.LMD : FS LIN/FL2 LOG - ADC



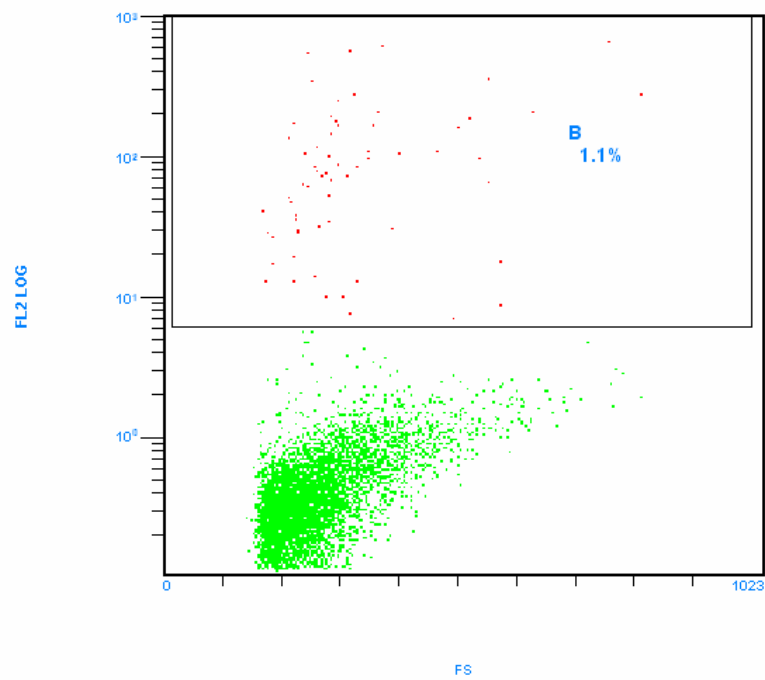
### 293T Zellen mit EHV gpn

(F1)[A] 6En 00003819 2322.LMD : FS LIN/FL2 LOG - ADC

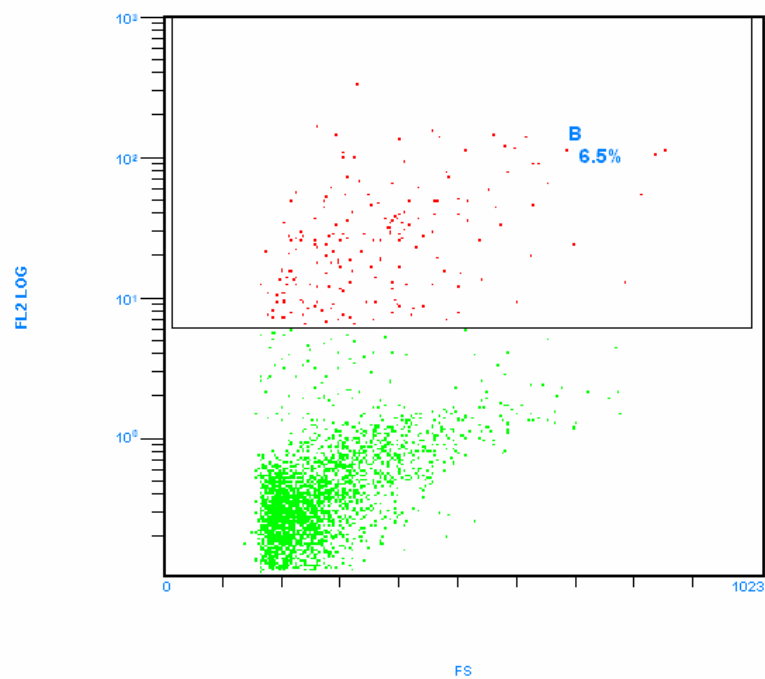


**293T Zellen mit p24 ohne PTD**

(F1)[A] 4En 00003820 2323.LMD : FS LIN/FL2 LOG - ADC

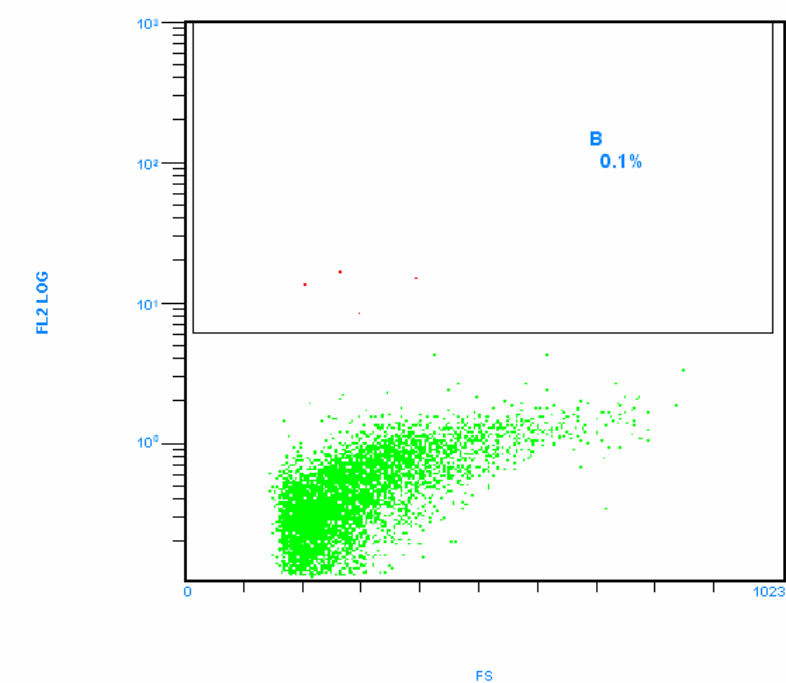
**293T Zellen mit p24 (N-term. PTD)**

(F1)[A] 1En 00003823 2326.LMD : FS LIN/FL2 LOG - ADC



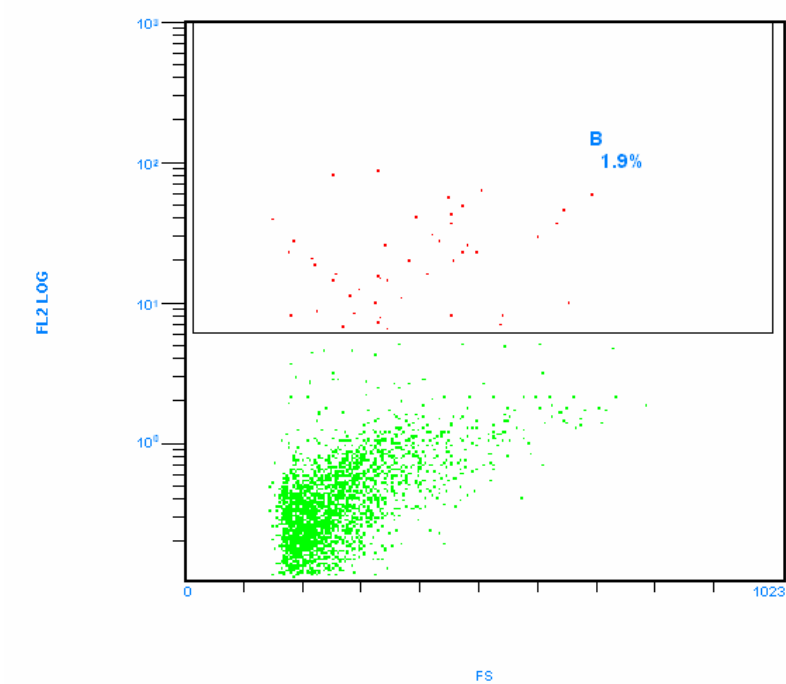
293T Zellen mit p24 (C-term. PTD)

(F1)[A] 3En 00003821 2324.LMD : FS LIN/FL2 LOG - ADC



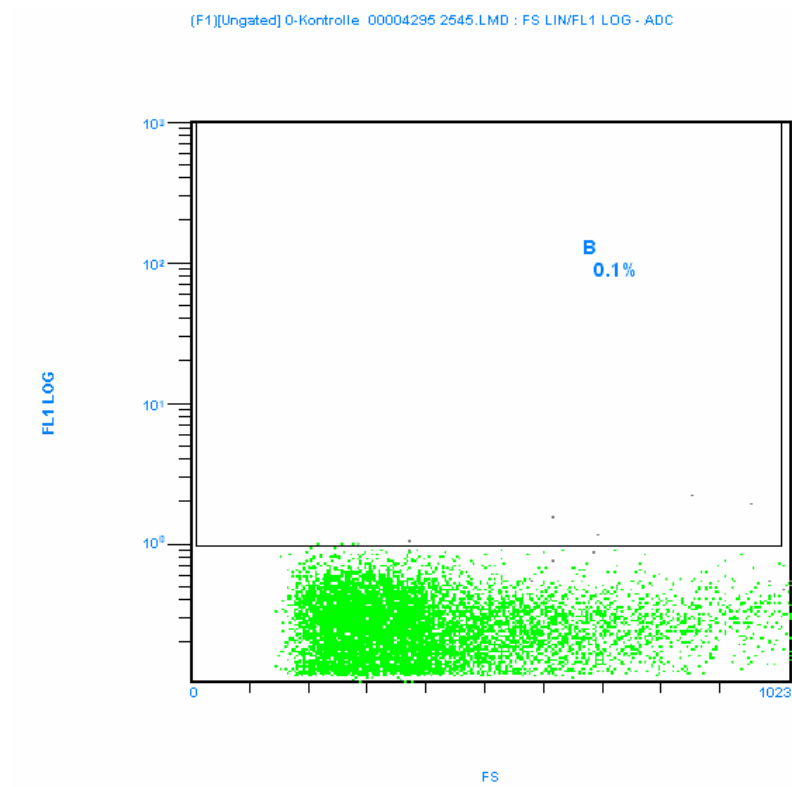
293T Zellen mit p24 (interne PTD)

(F1)[A] 2En 00003822 2325.LMD : FS LIN/FL2 LOG - ADC

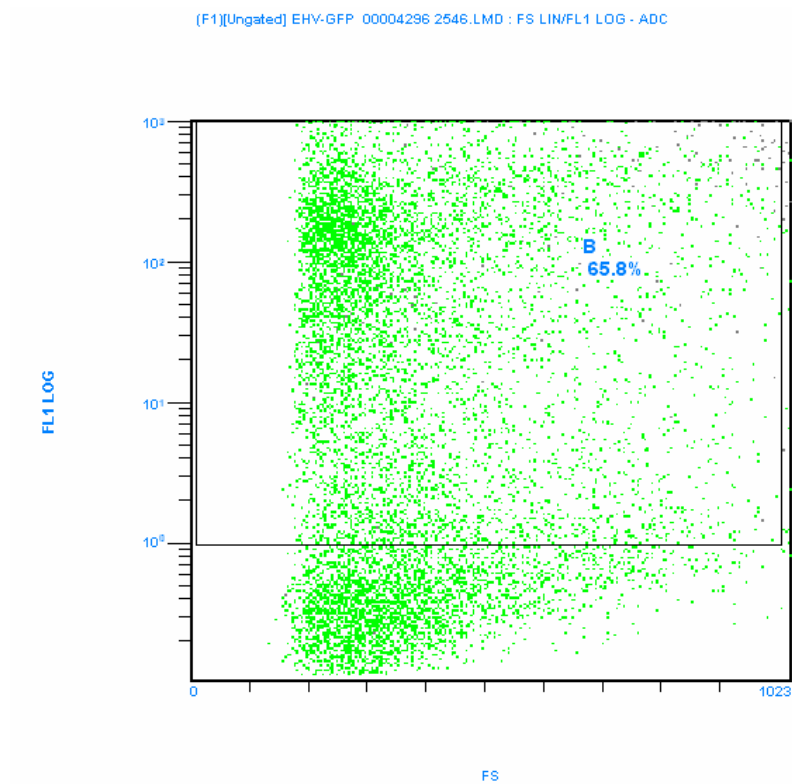


Intrazelluläre Messung der GFP Fusionskonstrukte nach über Nacht Inkubation:

### 293 T Zellen (Nullansatz)

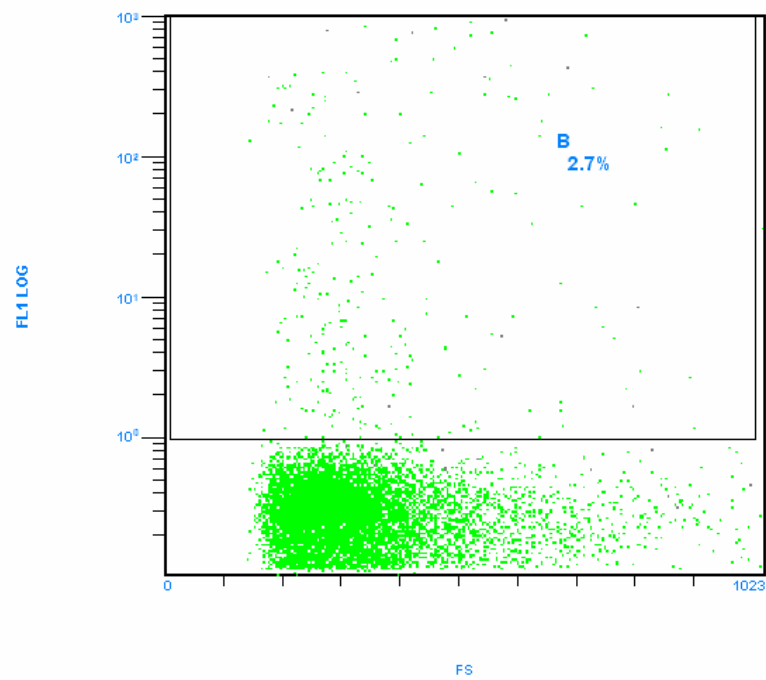


### 293T Zellen mit EHV GFP gpn

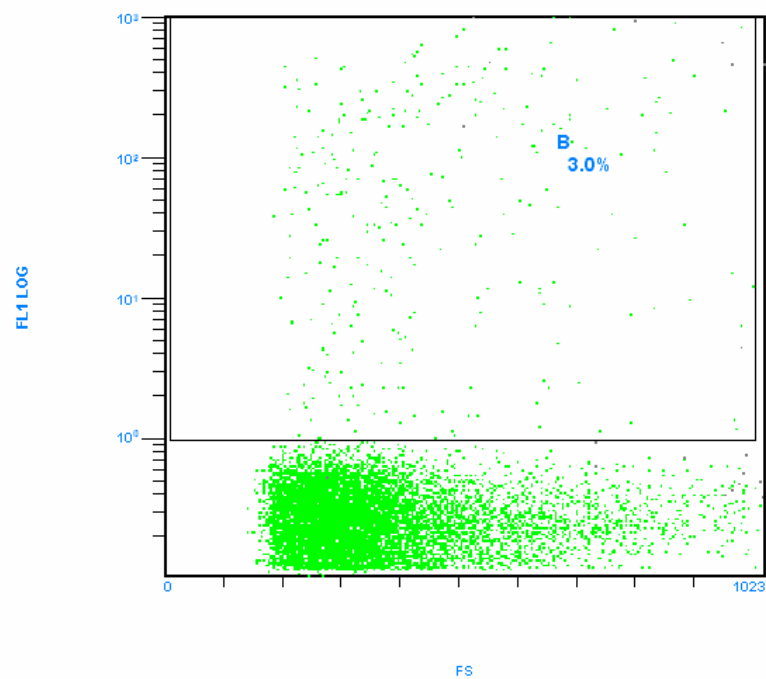


**293T Zellen mit GFP-p24 ohne PTD**

(F1)[Ungated] 4K GFP 00004297 2547.LMD : FS LIN/FL1 LOG - ADC

**293T Zellen mit GFP-p24 (N-term. PTD)**

(F1)[Ungated] 47K GFPPTD 00004298 2548.LMD : FS LIN/FL1 LOG - ADC



### 10.3 Sequenzen

Amyloid  $\beta_{42}$  Peptid optimiert auf *E.coli*:

```

NdeI                                     PflMI
1  CATATGGATGCGGAATTTTCGTCATGATAGCGGCTATGAAGTGCATCACCAGAACTGGTG
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+
   GTATACCTACGCCTTAAAGCAGTACTATCGCCGATACTTCACGTAGTGGTCTTTGACCAC
       D _ A _ E _ F _ R _ H _ D _ S _ G _ Y _ E _ V _ H _ H _ Q _ K _ L _ V _

61  TTCTTTGCGGAAGATGTGGGCAGCAACAAAGGCGCGATTATTGGTCTGATGGTGGGCGGT
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+
   AAGAAACGCCTTCTACACCCGTCGTTGTTTCCGCGCTAATAACCAGACTACCACCCGCCA
   F _ F _ A _ E _ D _ V _ G _ S _ N _ K _ G _ A _ I _ I _ G _ L _ M _ V _ G _ G _

SmaI
121 GTTGTTATTGCGCCCGGG
   -----+-----
   CAACAATAACGCGGGCCC
   V _ V _ I _ A _

```

Amyloid  $\beta_{42}$  Peptid wt:

```

NdeI          EcoRI          HinfI
1  CATATGGATGCAGAAATCCGACATGACTCAGGATATGAAGTTCATCATCAAAAATTGGTG
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+
   GTATACCTACGTCTTAAGGCTGTACTGAGTCCTATACTTCAAGTAGTAGTTTAAACCAC
       D _ A _ E _ F _ R _ H _ D _ S _ G _ Y _ E _ V _ H _ H _ Q _ K _ L _ V _

61  TTCTTTGCAGAAGATGTGGGTTCAAACAAAGGTGCAATCATTGGACTCATGGTGGGCGGT
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+
   AAGAAACGTCTTCTACACCCAAGTTTGTTCACGTTAGTAACCTGAGTACCACCCGCCA
   F _ F _ A _ E _ D _ V _ G _ S _ N _ K _ G _ A _ I _ I _ G _ L _ M _ V _ G _ G _

SmaI
121 GTTGTCATAGCGCCCGGG
   -----+-----
   CAACAGTATCGCGGGCCC
   V _ V _ I _ A _

```

## 10.4 Abkürzungsverzeichnis

A $\beta$	amyloid- $\beta$
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i>
BA	Batchansatz
BcCSP	Kälteschockprotein aus <i>Bacillus caldolyticus</i>
BSA	Rinderserumalbumin
BsCSP	Kälteschockprotein aus <i>Bacillus subtilis</i>
CA	Capsidprotein von HIV
CAT	Chloramphenicolacetyltransferase
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CECF	<i>continuous exchange cell free</i>
CFCF	<i>continuous flow cell free</i>
CSP	<i>cold shock protein</i>
Da	Dalton
DEAE	Diethylaminoethyl-
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dt <sub>7</sub>	hepta- 2' desoxy- thymidylat
DTNB	5,5'-Dithio-bis-(2Nitrobenzoesäure)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EK <sub>L</sub>	leichte Kette der Enterokinase
ELSIA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
g	Erdbeschleunigung
GFP	grün fluoeszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
int	intern
IVT	<i>In-vitro</i> Transkription/Translation
kDa	Kilodalton
LIC	ligationsunabhängiges Klonieren

MBP	maltosebindendes Protein
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mM	millimolar
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MWCO	<i>Molecular weight cut off</i>
Ni-NTA	Nickel-Nitril-Triessigsäure
NLS	Kernlokalisationssequenz
NMR	Kernmagnetresonanz
NW	Nullwert
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PEP	Phosphoenolpyruvat
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTD	Protein-Transduktions-Domäne
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RP-HPLC	<i>Reversed Phase-High Pressure Liquid Chromatography</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RTS	<i>Rapid Translation System</i>
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TAR	<i>trans acting response element</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEV	<i>Tobacco-Etch-virus</i>
<i>TmCSP</i>	Kälteschockprotein aus <i>Thermotoga maritima</i>
tRNA	<i>transfer RNA</i>
UTR	untranslatierter Bereich



## 11 Danksagung

Allen Personen, die am Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren, möchte ich hiermit meinen herzlichsten Dank aussprechen. Vor allem Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer möchte ich für die Themenstellung und die Betreuung dieser Dissertation danken. Höchster Dank gebührt weiterhin Dr. Gudrun Horn für ihre stetige Erreichbarkeit bei den kleinen und großen Problemen eines Doktoranden und ihre immer überaus hilfreichen Ratschläge und die sehr nette Atmosphäre im Labor.

Darüber hinaus schulde ich unendlich viel Dank unserer Laborassistentin Emmi Fuchs, ohne deren Organisation, Fürsorge und Toleranz mein kreativer Arbeitsstil nicht durchführbar gewesen wäre.

Bei Prof. Dr. Ralf Wagner bedanke ich mich für die freundliche Übernahme der Zweitbegutachtung und die Bereitstellung synthetischer Gene. Im Bezug auf die synthetischen amyloid- $\beta$  Klone gilt darüber hinaus mein Dank Dr. Marcus Graf (GENEART, Regensburg). Weiterhin bin ich im Bezug auf das p24 Projekt Dr. Kurt Bieler und Katharina Schmid für die ELISA-Tests, die FACS-Analysen und die weitere Unterstützung dankbar.

Bei Norman Kachel möchte ich mich für die Hilfe bei der Suche nach der richtigen Fitfunktion und die Durchsicht des Manuskripts bedanken.

Peter Geyer möchte ich für die Probe an amyloid- $\beta$  Peptid und die wissenschaftlichen Diskussionen danken.

Für die Hilfe bei der Durchführung der *in-vitro* Transkriptions- und RNA-Analytik möchte ich mich bei Dr. Thomas Langmann und den anderen Mitgliedern des Lehrstuhls für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Universitätsklinik Regensburg bedanken.

Bei Prof. Dr. F.X. Schmid möchte ich mich für die freundliche Überlassung der B $\alpha$ CSP und B $\alpha$ CSP Expressionsklone bedanken.

Gunter Stier danke ich für die Bereitstellung des Expressionsklons für die TEV-Protease.

Bei Prof. Dr. Tobias Hartmann bedanke ich mich für die Bereitstellung von A $\beta$ -Klonen.

Prof. Dr. Deutzmann und Eduard Hochmuth möchte ich für die Massenspektrometrie und die Ansequenzierungsarbeiten danken.

Prof. Dr. Penke (Szeged, Ungarn) danke ich für die Bereitstellung von synthetischem A $\beta$ -Peptid.

Abschließend möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Lehrstuhls für die nette Atmosphäre bedanken.

## 12 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Regensburg, August 2006

---

Roland Hofweber